

PROTOPLASMA

IN VERBINDUNG MIT R. CHAMBERS UND W. SEIFRIZ
BEGRÜNDET VON FRIEDL WEBER UND JOSEF SPEK

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

J. BRACHET	N. KAMIYA	H. KINZEL	A. PISCHINGER	S. STRUGGER
BRUXELLES	OSAKA	WIEN	WIEN	MÜNSTER

HERAUSGEGEBEN VON

K. HÖFLER	E. PERNER	K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN
WIEN	HANNOVER	BONN

BAND LIII, HEFT 3
MIT 88 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 20. JANUAR 1961



WIEN
SPRINGER-VERLAG
1961

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint swangios in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. K. Höfler, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität, Wien I, Dr.-Karl-Lusger-Ring 1, Österreich, oder

Prof. Dr. E. Perner, Botanisches Institut der Tierärztlichen Hochschule, Hannover-Kirchrode, Bünteweg 17, Westfalenhof, Deutschland, oder

Dozent Dr. K. E. Wohlfarth-Bottermann, Zentral-Laboratorium für angew. Übermikroskopie der Universität Bonn, Poppelsdorfer Schloß, Deutschland

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mölkerbastei 5

Fernsprecher: 63 96 14 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschriften die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfertig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Besitzer der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1½ Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostensersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

LIII. Band

Inhaltsverzeichnis

3. Heft

Abhandlungen

Kenda, Griseldis: Einschlusskörper in den Epidermiszellen von <i>Chlorophytum comosum</i>	305
Biehl, R., W. Uri und Gertrude Janeček: Untersuchungen über Strahlenschutz an Pflanzenzellen. I.	320
Horie, K.: The Behavior of the Petals in the Fading of the Flowers of <i>Tradescantia reflexa</i>	377
Olszewska, Maria J.: Recherches autoradiographiques sur la formation du phragmoplaste	387
Olszewska, Maria J.: L'effet de β -mercaptoéthanol et de l'urée sur la structure du phragmoplaste	397
Straus, W.: Studies on the Chromoplasts of Carrots	405
Kinzel, H., und R. Imb: Über Vitalfärbung stark saurer Zellsäfte und eine Methode zur pH-Bestimmung in vivo	422
Sitte, P.: Zum Bau der Plastidenzentren in Wurzelproplastiden	438
Klima, J., und R. Jarosch: Das Characeen-Protoplasma und seine Inhaltkörper. (II. Elektronenmikroskopischer Befund)	443

Referate

451

Einschlußkörper in den Epidermiszellen von *Chlorophytum comosum*¹

Von

Griseldis Kenda

Aus dem Institut für Anatomie und Physiologie der Pflanzen der Universität Graz

Mit 21 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. Juli 1960)

Chlorophytum comosum ist eine cytologisch schon recht gut bekannte Pflanze. Über das Zustandekommen der Panaschüre, wegen der die Pflanze gerne kultiviert wird, hat u. a. Collins (1922) und Renner (1935) gearbeitet; ausführliche Untersuchungen über das Vorkommen von Proplastiden hat Strugger (1953) und Strugger und Losada-Villasante (1955) angestellt. Um so erstaunlicher war es nun, als zunächst durch Zufall in den Epidermiszellen dieser Pflanze Inhaltskörper bzw. Zelleinschlüsse vorgefunden wurden, die offenbar der Aufmerksamkeit früherer Untersucher entgangen waren. Über sie soll nachstehend berichtet werden.

1. „Sphärite“

Zunächst fielen in der Epidermis der Unterseite panaschierter Blätter zarte feine Strahlengebilde von radiärem Bau auf, die unregelmäßig und unscharf begrenzten Sphäriten glichen (Abb. 1). Sie sind oft von beträchtlicher Größe, ihr Durchmesser entspricht dann der ganzen Breite der Zelle (Abb. 6); teilweise weichen die Strahlen an den Längswänden der Epidermiszellen auseinander, was auf eine gewisse Biegsamkeit oder Plastizität schließen läßt (Abb. 2). Sie sind nur auf einige wenige Zellen beschränkt. Auch an der Blattoberseite kommen sie vor. Jedoch sind sie hier noch seltener und auch etwas kleiner. Sie treten in den weißen wie in den grünen Arealen des Blattes auf, meistens in der Umgebung der Spaltöffnungen, in den Schließzellen selbst jedoch nie. In der Nähe der Mittelrippe bzw. oberhalb der Gefäße, wo die Zellen schmal und langgestreckt sind, und Stomata fehlen, trifft man sie kaum. In der Erdwurzel und den Luftwurzeln sowie in der Blüte wurden sie nie beobachtet.

¹ Dem Andenken meines unvergeßlichen Lehrers Professor Friedl Weber gewidmet.

Wie die Abb. 1 bis 11 zeigen, ist die morphologische Mannigfaltigkeit selbst innerhalb eines einzigen Flächenschnittes groß. In manchen Fällen sind die Kristalldrüsen von einer Zartheit, daß sie nur bei genauer mikroskopischer Betrachtung mit starker Vergrößerung zu erkennen sind, andere wieder sind recht kompakt und fallen schon bei schwacher Vergrößerung durch die leicht gelblichbraune Färbung auf. Meist sind die Nadeln um ein

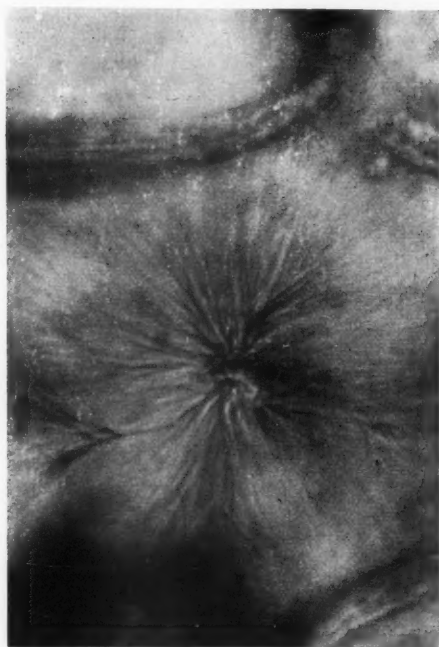


Abb. 1. *Chlorophytum comosum*, Blattepidermis², Kristalldruse, einzelne Kristallnadeln verästelt.

nicht deutlich erkennbares Zentrum strahlig angeordnet. Auch können die Nadeln offenbar Protuberanzen bilden, die fast die ganze Zelle hinziehen. Diese Kristallzöpfe ähneln denen, die Miličić und Plavšić (1956) bei *Epiphyllum truncatum* und *Opuntia brasiliensis* beschrieben haben. Die von den beiden Autoren angegebene große Labilität gegenüber Essigsäure und KOH trifft aber für die Kristallaggregate von *Chlorophytum comosum* nicht zu.

Seltener erscheinen die Sphärite zerfallen und die Zellen mit einzelnen ungeordneten Nadeln oder Nadelbüscheln erfüllt. Auch können die sphäritisch angeordneten Kristallnadeln noch von kurzen tangentialen Stäbchen durchkreuzt werden, so daß der Eindruck einer zarten, mehrschichtigen, konzentrischen, jedoch stellenweise unterbrochenen „Hülle“ ent-

steht (Abb. 7). In diesem Stadium ist eine leichte Braunfärbung des gesamten Zellinhaltes zu beobachten. Man trifft auch mitten im gesunden Gewebe auf einzelne nekrotische Zellen, deren Inhalt sich grobkörnig um die Kristalldrüsen zusammenballte (Abb. 14). Auch diese Zellen sind braun gefärbt. Es hat den Anschein, daß die Braunfärbung des Zellinhaltes sowie auch der Kristallaggregate prämortale Vorgänge sind.

Die Kristalldrüsen nehmen fast immer die Mitte der Zelle ein und liegen hier offensichtlich in der Vakuole, wie orientierende Plasmolyseversuche mit

² Sämtliche Aufnahmen beziehen sich auf die Epidermis der Blattunterseite von *Chlorophytum comosum*.

neutralrotgefärbter 1-molarer Rohrzuckerlösung ergeben haben. Ob die Vakuole allerdings auch der Ort ihrer primären Entstehung ist, ist zu bezweifeln. Gelegentlich liegen kleine Kristalldrüsen in der Nähe des Zell-

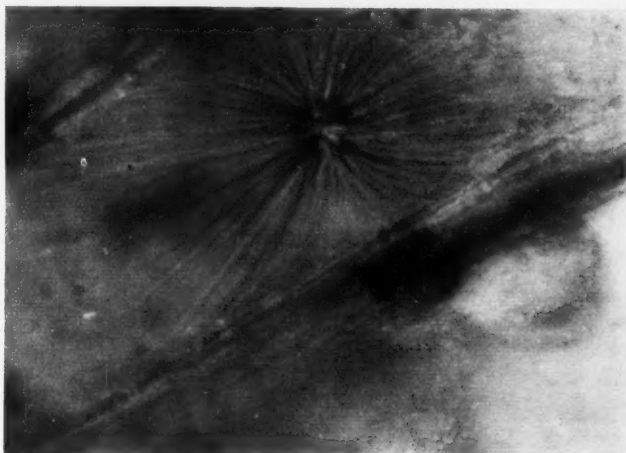


Abb. 2. Kristalldruse, sich an die Zellform anpassend.

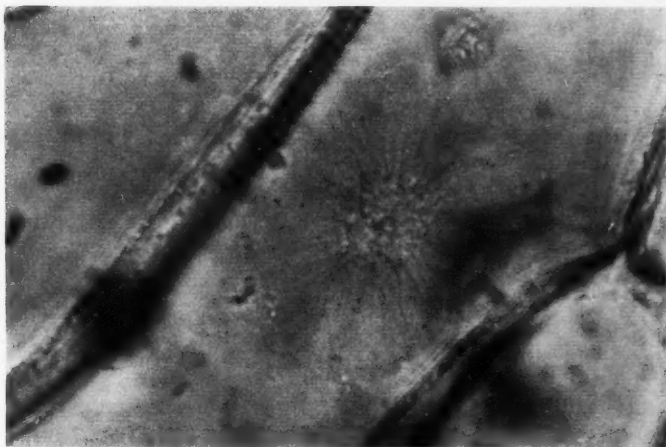


Abb. 3. Kristalldruse mit deutlich körnigem Zentrum, daneben ein x-Body.

kernes; oftmals sind sie mit dem Kern zusammen von Plasma und Plastiden umgeben. Es könnte sein, daß diese Kristallaggregate im Plasma ihren Ursprung haben und erst sekundär in die Vakuole übertreten.

Proteinkörper mit intravakuolärer Lokalisation wurden bis vor kurzem

noch bei keiner Virose gefunden. Die kristallinen Einschlüsse von Tabakmosaikvirus finden sich regelmäßig im Plasma. Martin und McKinney (1938) haben nachgewiesen, daß dieses Virus im Zellsaft nicht existiert.



Abb. 4. Kristallzopf.

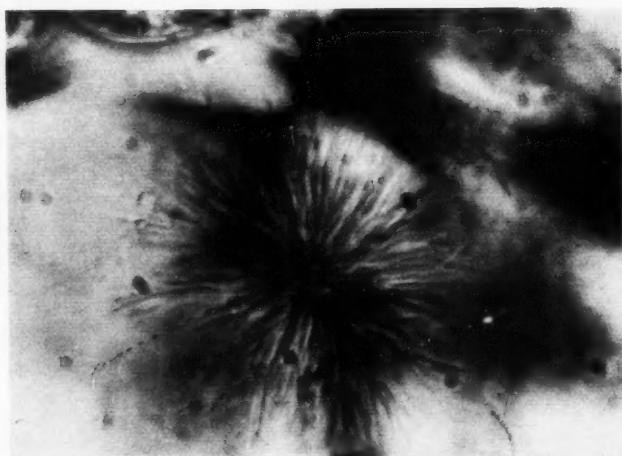


Abb. 5. Kristalldruse.

Demgegenüber haben Miličić und Plavšić (1956) beobachtet, daß die Eiweißdrusen von einem viruskranken *Epiphyllum* in der Vakuole liegen. In einer anderen Arbeit fand Miličić (1956) ebenfalls rhombenförmige Eiweißplättchen im Zellsaft lokalisiert.

Wie aus Abb. 10 zu sehen ist, sind manche Kristalldrüsen von einer äußerst zarten „Hülle“ ganz umgeben. Die „Hülle“ kann auch von einigen Kristallnadeln durchstoßen werden (Abb. 11). Um diese zarte Membran



Abb. 6. Kristalldruse füllt die ganze Zelle aus, daneben ein x-Body mit wenigen, unregelmäßig verteilten Tröpfchen im Innern.

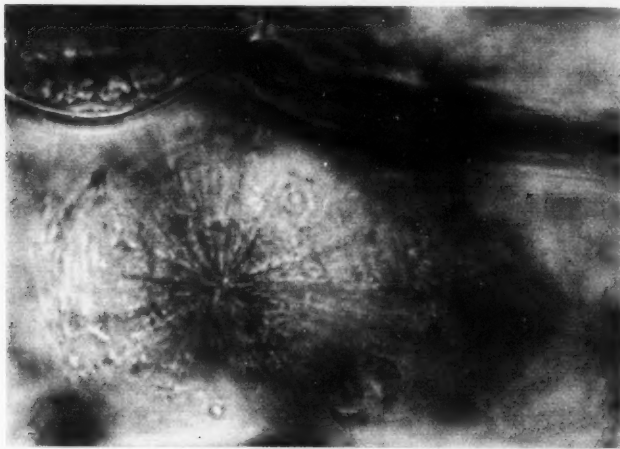


Abb. 7. Kristalldruse von tangential gerichteten Kristallstäbchen durchkreuzt.

sammeln sich kleine Tröpfchen lipoider Natur an, die vom strömenden Protoplasma herangeführt werden. Durch die intensive Plasmabewegung kommen einzelne Plasmafäden mit den Kristalldrüsen in Berührung, bleiben hier an den Nadelspitzen hängen und umspinnen gleichsam das ganze

Kristallgebilde. Dabei wird es, wie im Mikroskop unmittelbar schön zu beobachten ist, oft um die eigene Achse gedreht. Vielleicht läßt sich so das Entstehen der „Hülle“ erklären.

In einem Falle wurde beobachtet, wie sich ein Plasmastrang von der Zellwand losriß, quer durch den Vakuolenraum floß, dabei mit einem anderen Plasmafaden in Fusion trat, dann tropfenartig an die Nadeln heranfloß und hier festgehalten wurde. Etwas später sonderte sich daraus eine Plasma-

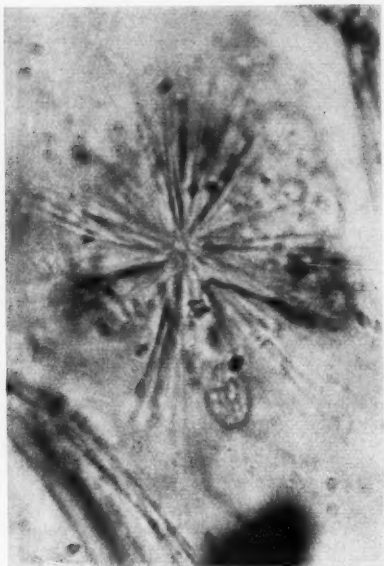


Abb. 8.

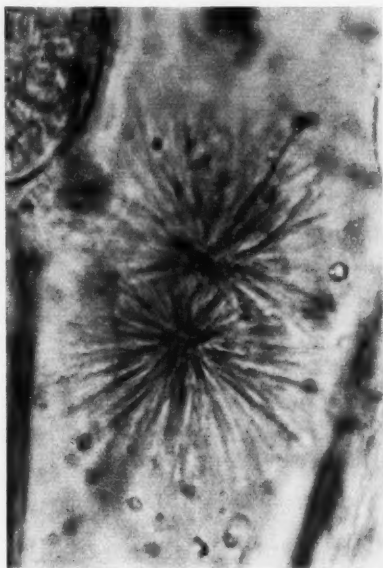


Abb. 9.

Abb. 8. Kristalldruse aus einigen Kristallbüscheln gebildet, daneben ein x-Body.

Abb. 9. Kristalldrusenzwilling.

kugel mit tröpfchenartigem Inhalt ab. Es wird vermutet, daß auf diese Weise sich die Cytoplasmakugeln (Beschreibung weiter unten) bilden; auf die gleiche Weise entstehen die x-Bodies, die Sheffield (1931) ausführlich beschrieben hat. Ähnliche Ansammlungen von Lipoidtröpfchen an intensiv blau gefärbten strahligen Anthocyankörpern hat Scharinger (1936) in der Epidermis der Blütenblätter von *Delphinium cultorum* Voss gesehen. „Sie finden sich anscheinend immer gleichzeitig mit den Anthocyankristallen ... und sitzen dann an den Enden der zarten Kristallnadeln, einen Kranz bildend ...“ (Scharinger 1936, S. 413).

Trotz ihrer Zartheit sind die Kristalldrusen gegenüber konzentrierten Säuren, wie Schwefelsäure, Salzsäure, Essigsäure, Salpetersäure sowie Alkalien, äußerst widerstandsfähig; auch in Äther, Chloroform und Aceton sind sie unlöslich. In Wasser bleiben sie lange Zeit unverändert erhalten.

Sehr gut lassen sie sich in 4%igem Formalin fixieren, während absol. Alkohol nach längerem Verweilen der Schnitte eine zarte Granulation der Kristallaggregate bewirkt, wobei aber die strahlige Natur noch erkennbar bleibt (Abb. 12). Dieses Verhalten könnte für Lipoide sprechen, die Sudanfärbung fällt aber negativ aus. In Osmiumsäure bräunen sich die Kristalle zwar, es kommt jedoch bei Alkoholzusatz zu keiner Schwarzfärbung, wie es nach T u n m a n n (1931) für Lezithine charakteristisch ist. Die Eiweißreak-



Abb. 10.

Abb. 10. Deutliche „Hülle“ um die Kristalldruse, umgeben von größeren und kleineren Lipoidkügelchen.



Abb. 11.

Abb. 11. „Hülle“ von einzelnen Kristallnadeln durchstoßen.

tionen (Millon, Xanthoprotein) fallen am lebenden Objekt negativ aus, bei fixierten Schnitten färben sich die Kristalle schwach gelb. In Jod-Jod-Kali färben sich die Sphärite nicht, nur im Zentrum ist eine leichte Gelbfärbung zu erkennen. Mit Chlorzinkjod werden sie goldgelb, wobei sich der Sphärit nach längerem Einwirken in eine zartkörnige Masse umwandelt (Abb. 13). Die B a l d's Stain, nach der Modifikation nach R a w l i n s (1957), zeigte eine Rosafärbung der Kristalle sowie der Zellkerne und Plastiden.

2%iges Eisenchlorid läßt die Kristalldrusen transparent erscheinen, die homogenen Kristallnadeln zeigen körnelige Struktur, eine Färbung tritt nicht ein. Demnach sind Gerbstoffe auszuschließen.

Bei Behandlung in konzentrierter Natronlauge + 20%igem Ammoniak (Fettnachweis nach M o l i s c h 1923) verändern sich die Kristalldrusen kaum,

was gegen ihre Fettnatur spricht. Allerdings ist nicht auszuschließen, daß vielleicht eine isomorphe Umlagerung der ursprünglichen Kristalle in Seifen-
nadeln stattgefunden haben könnte.

Verdauungsversuche mit Trypsin und Pepsin fielen negativ aus.

Die Hitzeresistenz ist äußerst hoch. Bis zum Siedepunkt des Wassers bleiben die Kristalle unverändert.

Lebend nehmen die Kristallaggregate weder Neutralrot noch Methylen-

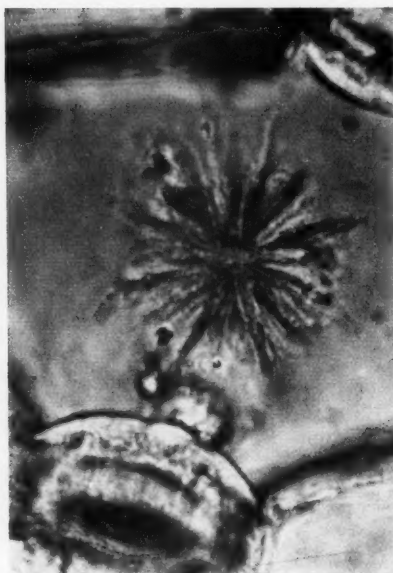


Abb. 12.

Abb. 12. Kristalldruse fixiert in 96%igem Alkohol.

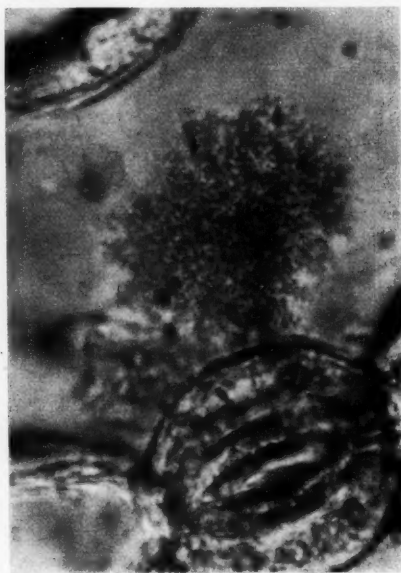


Abb. 13.

Abb. 13. Kristalldruse nach Chlorzinkjodbehandlung.

blau oder Säurefuchsin an. Im fixierten Zustand jedoch färben sie sich oftmals recht intensiv, wobei die Methylenblaufärbung eine Metachromasie hervorruft: Die Kristalle sind blaugrün, der übrige Zellsaft ist rein blau gefärbt. Die Färbung läßt sich mit CaCl_2 oder Ammoniak nicht mehr auswaschen, was für eine chemische Bindung spricht. Andererseits färbt Säurefuchsin die Kristalle bei pH 7 (Leitungswasser) nicht an, in schwacher Essigsäurelösung jedoch stark. Die Kristallkörper verhalten sich also in dieser Hinsicht wie Eiweißkörper (nach Strugger 1949).

Auf Grund ihres chemischen Verhaltens kann nur gesagt werden, daß es sich bei den Kristalldrusen um chemisch noch nicht eindeutig definierbare Substanzen von vermutlich lipoider und eiweißartiger Natur handeln dürfte, die sich noch aus einem Komplex anderer Stoffe zusammensetzen. Auffällig ist, daß die Kristalldrusen keine Doppelbrechung erkennen lassen. Eine

solche wäre bei der Gestalt der Nadeln oder Strahlen der Sphärite, die auf eine bestimmte Orientierung der Moleküle hindeutet, zu erwarten gewesen: vielleicht sind die Nadeln zu zart, so daß mit den zur Verfügung stehenden Mitteln (Reichert Polarisationsmikroskop) die Doppelbrechung nicht sichtbar ist.

Es wurden auch noch *Chlorophytum*-Pflanzen anderer Herkunft sowie auch das nicht panaschierte *Chlorophytum elatum* zur Beobachtung herangezogen. Zum Teil stammen die Pflanzen aus den Gewächshäusern des Grazer und Wiener Botanischen Gartens, zum Teil aus Privatbesitz. Es zeigte

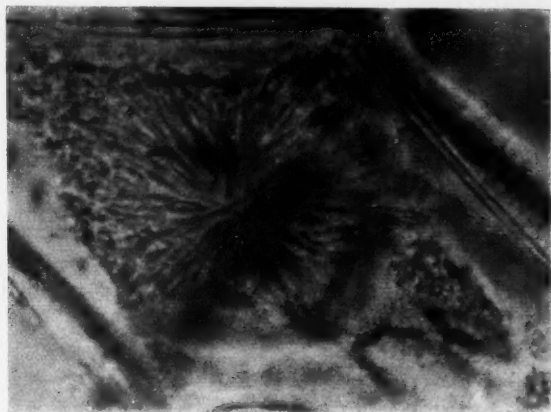


Abb. 14. Nekrotische Zelle in der Epidermis der Blattunterseite. Kristalldruse von körnigem Zellinhalt umgeben.

sich, daß auch diese Pflanzen, aber nicht alle, große Kristallaggregate in ihren Epidermiszellen haben.

Soweit mir die Literatur über diese Pflanze bekannt ist, liegen noch keine Beobachtungen der oben erwähnten Gebilde vor. Wohl hat Sollá (1920) schon prismatische und viereckige Eiweißkristalloide in den Zellkernen der Laubblätter von *Chlorophytum comosum* und zwar in den Epidermiszellen und sogar in den Schließzellen gefunden. Der Autor beschränkt sich nur auf diese kurze Mitteilung und erwähnt leider nicht, ob es sich um ein panaschiertes Exemplar gehandelt hat. Bei vorliegenden Untersuchungen wurden Kernkristalloide nie beobachtet.

Es liegt der Verdacht nahe, daß es sich hier um eine Viruserkrankung handelt. Dieser wurde noch dadurch bestärkt, daß neben den Kristalldrusen auch noch, wenn auch selten, Spindeln beobachtet wurden, die mit den Spindeln viruskranker Pflanzen auffallende Ähnlichkeit haben. Sie geben eindeutig die Millon-Reaktion, es handelt sich hiemit also um Eiweißspindeln. Von Weber (1954) wurden erstmalig auch bei Liliaceen (*Lilium Henryi*) Eiweißspindeln gefunden und mit den x-Bodies als cytologische Symptome einer Virusinfektion gedeutet.

2. Eiweißspindeln und Cytoplasmakugeln

Die Eiweißspindeln von *Chlorophytum comosum* (und auch *Chlorophytum elatum*) haben fibrilläre Struktur, sind in der Mitte bauchig und laufen an den Enden in lange dünne Fäden aus (Abb. 17). Sie sind stark doppelbrechend und geben mit Jodlösungen die gleichen Reaktionen wie die bekannten Eiweißspindeln der virösen Kakteen.

Die Spindeln liegen entweder allein in der Zelle oder sie treten gemeinsam mit den Kristalldrusen auf (Abb. 18–20).

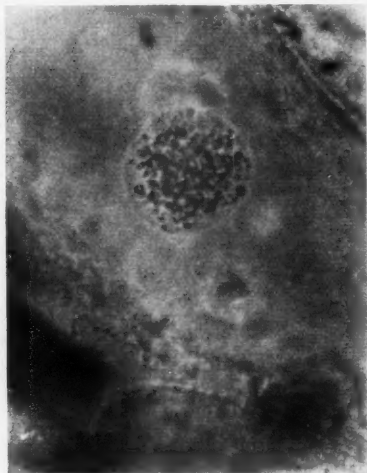


Abb. 15.



Abb. 16.

Abb. 15. Blattepidermiszelle mit einem x-Body.

Abb. 16. Blattepidermiszelle mit mehreren verschieden geformten x-Bodies.

Außer diesen Eiweißspindeln findet man noch ein oder mehrere runde Gebilde, die auffallende Beweglichkeit zeigen und in ihrem Innern Tröpfchen oder Körnchen haben, die ebenfalls in äußerst lebhafter BMB sind. Sie gleichen den Cytoplasmaballen, die Scharinger (1936) bei *Delphinium cultorum* gefunden hat (Abb. 15 und 16). Die auffallende Ähnlichkeit dieser Gebilde mit den protoplasmatischen Einschlußkörpern, den x-Bodies viruskranker Pflanzen, veranlaßte Reiter und Weber (1958) zu neuerlichen Untersuchungen dieser Pflanze. Es zeigte sich, daß sich die „Cytoplasmakugeln“ von *Delphinium* fluoreszenzoptisch genau so verhalten wie die von Reiter (1957) beobachteten x-Bodies in viruskranken *Aichryson*-Arten. Bei Fluorochromierung mit dem basischen Fluorochrom Coriphosphin leuchten die eingeschlossenen Partikelchen gelbgrün. Die Autoren vermuten, daß die „Cytoplasmakugeln“ von *Delphinium* demnach ebenfalls Viruseinschlußkörper sind.

Auch die Cytoplasmakugeln von *Chlorophytum comosum* (und auch



Abb. 17.



Abb. 18.

Abb. 17. Eiweißspindeln, in der Mitte fibrillär und aufgetrieben.

Abb. 18. Eiweißfibrillenbündel durch zarten Plasmafaden mit dem wandständigen Kern verbunden.

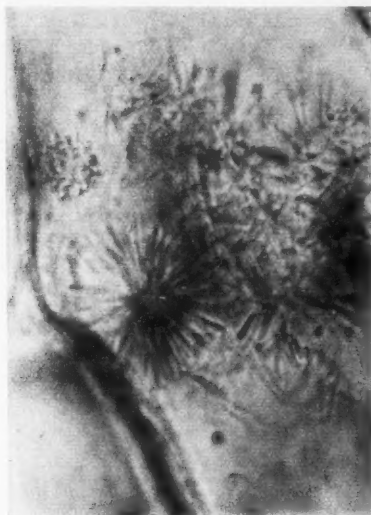


Abb. 19.



Abb. 20.

Abb. 19. Blattepidermiszelle mit x-Body, einer kleinen Kristalldruse und ungerichteten Kristallnadeln.

Abb. 20. Blattepidermiszelle mit Kristallaggregaten, mehreren x-Bodies in verschiedener Größe und eine Eiweißspindel.

Chlorophytum elatum) zeigen das gleiche Fluoreszenzbild. Dieses Verhalten und nicht zuletzt ihre Seltenheit sowie das gleichzeitige Auftreten von Eiweißspindeln unterstützen den Verdacht, daß auch bei *Chlorophytum* diese Cytoplasmakugeln als protoplasmatische x-Körper anzusprechen sind.

Die x-Bodies sind, wenn sie in der Einzahl in der Zelle vorkommen, ansehnlich groß (Abb. 15). Meistens trifft man sie aber zu mehreren in einer Zelle, dann sind sie bedeutend kleiner. Ihre Lage in der Zelle konnte nicht geklärt werden. Manchmal scheinen sie im Protoplasma zu liegen — sie pendeln ohne eigentliche Ortsveränderung hin und her —, manchmal kann man sie aber mit beachtenswerter Beweglichkeit den ganzen Zellraum durchqueren sehen, wobei sie oft amöboidartige Fortbewegung zeigen. Im letzteren Fall dürften sie vermutlich in der Vakuole liegen. Auch Scharinger (1936) war sich über die Lage dieser Körper im Zweifel, denn er sagt: „In den meisten Fällen sieht es aber jedenfalls so aus, als ob diese Plasmakugeln in *travakuoläres* Cytoplasma wären.“ Ihre Form ist meist kugelig, kann aber auch länglich oval sein (Abb. 16). Die im hyalinen Plasma suspendierten Tröpfchen (ab und zu hatten sie auch körnigen Charakter) sind ungefähr gleich groß, aber nicht immer über den ganzen Raum gleich verteilt. Ähnliches ist auch Scharinger aufgefallen. Die im x-Body eingeschlossenen Tröpfchen gleichen den im Protoplasma befindlichen Öltröpfchen und geben wie diese eine schwache Sudan-Reaktion. Scharinger (1936) vertritt die Ansicht, daß die Cytoplasmaballen von *Delphinium*, auch wenn sie in der Vakuole liegen, immer durch einen Plasmafaden mit dem wandständigen Plasma in Verbindung stehen. Für *Chlorophytum* dürfte das nicht zutreffen, da ja das hyaline Plasma der Kugeln äußerst niedrige Viskosität besitzt, wie man an der intensiven BMB der im Inneren gelegenen Tröpfchen erkennen kann und dann müßten sie tropfenartig ausgezogen sein. Dies war aber nur selten der Fall.

Die x-Bodies sind deutlich gegen das umgebende Medium abgegrenzt, von einer richtigen Membran aber kann man nicht sprechen. Nach Zusatz von 1-molarer Rohrzuckerlösung verliert die Kugel schnell an Volumen und die Tröpfchen fließen zu einigen größeren zusammen. Mit dem Kleinerwerden der Kugel nimmt die Beweglichkeit der Tröpfchen rapid ab und hört schließlich ganz auf. Dies dürfte wohl mit dem Wasserentzug und der dadurch bedingten Viskositätssteigerung zusammenhängen. Dasselbe ist auch zu beobachten, wenn ein x-Body an den Spitzen der Kristallnadeln hängenbleibt.

3. Kallose

Im Laufe der Untersuchungen ergab sich noch eine weitere beachtenswerte Eigenheit in den Epidermiszellwänden von *Chlorophytum comosum*. In einer Pflanze, die besonders zahlreiche Kristalldrüsen, Spindeln und x-Bodies führte, fielen polsterartige Wandverdickungen auf, die stets korrespondierend an beiden Seiten der Zellwände vorkommen (Abb. 21). Sie färben sich mit Anilinblau (nach Eschrich 1956), sind also Kallosebildungen und haben wohl auch hier die Aufgabe, die Tüpfel gegen einge-

drungene unerwünschte Stoffe zu verschließen. Der Kallosenachweis hat für die Diagnose von Viruserkrankungen in der Phytopathologie neuerdings große Bedeutung erlangt (Lit. bei E s c h r i c h 1956). So ruft z. B. das Blattrollvirus in der Kartoffel vermehrte Kallosebildung in den Siebröhren hervor. Daß sich diese Kallosepolster in den spindelfreien Exemplaren von *Chlorophytum comosum* nicht finden, ist als ein weiterer Beweis dafür anzusehen, daß die amorphen wie die kristallinen Einschlußkörper als von einem Virus verursachte Bildungen anzusehen sind oder ursächlich mit der Virusinfektion zusammenhängen.



Abb. 21. Blattepidermiszelle mit drei kleinen Kristalldrusen, an den Zellwänden polsterartige Kallosebildungen der Tüpfel.

An der Pflanze selbst sind äußerlich keine sichtbaren Krankheitserscheinungen zu bemerken. Es sei denn, daß das Welkwerden bzw. allmähliche Vertrocknen der Blattspitzen der Ausdruck einer virösen Erkrankung wäre. Die Buntblättrigkeit kann bei vielen Pflanzen die Folge einer Virose sein. In der einschlägigen Literatur ist von *Chlorophytum comosum* nichts bekannt (C o o k 1947, K ö h l e r und K l i n k o w s k i 1954, S m i t h 1957).

4. Übertragungsversuche

Um ganz sicher zu gehen, ob es sich tatsächlich um eine Virose dieser Pflanze handelt, wurde ein von Spindeln, x-Bodies und Kristallaggregaten freies Exemplar von *Chlorophytum comosum* mit dem Gewebssaft einer vermutlich viruskranken Pflanze, die die genannten Einschlüsse zeigte, infiziert. Nach etwa 5 Wochen fanden sich an der Einreibungsstelle die ersten Spindeln, x-Bodies und sogar Kristalle. Da die Kristalldrusen nur in spindelhaltigen Exemplaren auftreten, müssen sie wohl als Viruskörper

betrachtet werden. Es ist schon lange bekannt, daß neben den cytoplasmatischen Eiweißspindeln verschiedene andere Kristalloide in virösen Kaktéen vorkommen. Unter anderem seien hier erwähnt die Kristalleiweißdrusen von *Rhipsalis* und *Epiphyllum* (Weber, Kenda und Thaler 1952 a), die Stachelkugeln von *Opuntia monacantha* (Weber, Kenda und Thaler 1952 b), die Sphärite von *Cirsium arvense* (Kenda, Thaler und Weber 1952), die rhombischen Eiweißkörper von *Opuntia inermis* (Miličić 1956) und schließlich die von Miličić und Plavšić (1956) bei *Opuntia brasiliensis* und *Epiphyllum truncatum* entdeckten Eiweißdrusen.

Trotz verschiedener Reaktionen konnte leider die chemische Natur der Kristallaggregate von *Chlorophytum comosum* vorläufig nicht geklärt werden. Vielleicht bringen Fluorochromierungsversuche Klarheit. Hierüber wird an anderer Stelle berichtet werden.

Es ist vielleicht noch erwähnenswert, daß mit Beginn der Blühperiode sämtliche Einschlufkörper nur mehr sehr selten anzutreffen sind. Auch die Kallosebildungen sind dann vollkommen verschwunden. Hierin könnte vielleicht die Erklärung liegen, daß die hier beschriebenen Einschlüsse bisher der Beobachtung entgangen sind. Man könnte nun vermuten, daß diese cytologischen Einschlüsse Reservestoffe sind, die wiederum in den Stoffwechsel einbezogen werden. Es ist aber zu berücksichtigen, daß auch mitunter Stoffe resorbiert werden können, die nicht den Charakter von Reservestoffen tragen.

5. Kaktorubin

Anhangsweise sei erwähnt, daß neben den geschilderten Einschlüssen in *Chlorophytum comosum* in Epidermis- und Schließzellen ein roter Farbstoff auftritt. Leider waren in diesen Zellen keine Kristalldrusen vorhanden, so daß nicht festgestellt werden konnte, ob sie sich mit diesem Farbstoff tingieren, wie es die „Stachelkugeln“ von *Opuntia* zeigen, die Weber, Kenda und Thaler 1952 b in den Epidermiszellen dieser Pflanze gefunden haben. Die Kristallaggregate von *Chlorophytum comosum* sind aber mit diesen sicher nicht identisch, da sie sich unter anderem z. B. in Essigsäure lösen.

Zusammenfassung

In den Epidermiszellen von *Chlorophytum comosum* (und auch *Chlorophytum elatum*) kommen in den Vakuolen Kristalldrusen vor, deren chemische Natur noch nicht eindeutig festgestellt werden konnte. Da neben den Drusen auch noch lebhaft bewegliche Cytoplasmaballen, die als x-Bodies angesehen werden und auch fibrilläre Eiweißspindeln beobachtet wurden, wird angenommen, daß die erwähnten Kristalldrusen ebenfalls Stoffwechselprodukte virusinfizierter Zellen sind. Auch polsterartige Kallosebildungen an den Zellwänden dieser Zellen sowie die Übertragbarkeit durch Einreiben von Preßsaft verstärken die Vermutung, daß alle diese Inhaltskörper als Folge einer Virusinfektion in den Zellen entstanden sind.

Literatur

- Bald, J. G., 1949: A method for the selective staining of viruses in infected plant tissues. *Phytopathology* 39.
- Collins, E. J., 1922: Variegation and its inheritance in *Chlorophytum elatum* and *Chlorophytum comosum*. *J. Genet.* 12, 1.
- Cook, M. T., 1947: *Viruses and Virus Diseases of Plants*. Minneapolis.
- Eschrich, W., 1956: Kallose. *Protoplasma* 47.
- Kenda, Thaler und Weber, 1952: Sphärit-Bildung aus *Cirsium*-Zellsaft, Protoplasma 41.
- Köhler, E., und M. Klinkowski, 1954: Viruserkrankheiten. In: Sorauers Handb. der Pflanzenkrankheiten. II, 6. Aufl., Berlin-Hamburg.
- Martin, L. F., and H. H. McKinney, 1958: Tobacco-mosaic virus concentrated in the cytoplasm. *Science* 88.
- Miličić, D., 1956: Eiweißkristalloide in *Opuntia inermis*. *Österr. bot. Z.* 105.
- und B. Plavšić, 1956: Eiweißkristalloide in Kakteen-Virusträgern. *Protoplasma* 46.
- Molisch, H., 1925: *Mikrochemie der Pflanze*. 3. Aufl., Jena.
- 1928: Über ein bei den Kakteen vorkommendes, einen roten Farbstoff lieferndes Chromogen. *Ber. deutsch. bot. Ges.* 46.
- Rawlins, T. E., 1957: A Modification of Bald's Stain for Viruses and for Cell Inclusions Associated with Virus Infections. *Phytopathology* 47.
- Reiter, L., 1957: Vitale Fluorochromierung pflanzlicher Viruseinschlußkörper. *Protoplasma* 48.
- und F. Weber, 1958: Sind die „Cytoplasmakugeln“ von *Delphinium* x-Körper? *Protoplasma* 49.
- Renner, O., 1935: Zur Kenntnis der nichtmendelnden Buntheit der Laubblätter. *Flora* 150.
- Scharinger, W., 1956: Cytologische Beobachtungen an Ranunculaceen-Blüten. *Protoplasma* 25.
- Sheffield, F. M. L., 1951: The formation of intracellular inclusions on Solanaceous hosts infected with *Aucuba* mosaic of tomato. *Ann. appl. Biol.* 18.
- Smith, K. M. 1957: *Plant virus Diseases*. London.
- Solla, R. F., 1920: Über Eiweißkristalloide in den Zellkernen von *Albua*. *Österr. bot. Z.* 69.
- Strugger, S., 1949: *Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze*. Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- 1953: Über die Struktur der Proplastiden. *Ber. deutsch. bot. Ges.* 66.
- und M. Losada-Villasante, 1955: Die Plastiden in den albicaten Geweben der Blätter einer mediovariegaten Form von *Chlorophytum comosum*. *Protoplasma* 45.
- Tunmann, O., 1951: *Pflanzenmikrochemie*. 2. Aufl., Berlin.
- Weber, F., 1954: Eiweißkristalle von *Lilium Henryi*. *Phyton* 5.
- Kenda und Thaler, 1952 a: Viruskörper in Kakteen-Zellen. *Protoplasma* 41.
- — — 1952 b: „Stachelkugeln“ in *Opuntia*. *Phyton* 4.

Untersuchungen über Strahlenschutz an Pflanzenzellen

I. Schutzwirkung des Thioharnstoffes gegen kurzwellige UV-Strahlen¹

Von

Richard Biebl, Walter Url und Gertrude Janeček

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. August 1960)

Inhalt

Einleitung	321
Material und Methode	325
I. Die Wirkung der UV-Strahlen auf die unbehandelten Zellen	327
II. Wirkung des Thioharnstoffes auf die unbestrahlte Zelle	351
1. Resistenz gegen Thioharnstoff	351
2. Wirkung subletaler Thioharnstoffkonzentrationen auf das Protoplasma (Systrophe, Plasmaströmung, Plasmolyseform, Chondriosomen)	353
3. Die Permeabilität des Thioharnstoffes	356
III. Schutzwirkung des Thioharnstoffes gegen UV-Bestrahlung	345
1. Grundbeobachtungen	345
2. Abhängigkeit der Schutzwirkung von der Dauer der Vorbehandlung	345
3. Die Wirkung von Nachbehandlungen mit Thioharnstoff	348
4. Abhängigkeit der Schutzwirkung des Thioharnstoffes von seiner Konzentration	349
5. Andauer der Schutzwirkung	351
6. Wirkung des Thioharnstoffes auf die plasmatischen Veränderungen nach subletaler Bestrahlung	353
a) Plasmaströmung	353
b) Permeabilitätsverhältnisse	354
c) Morphologische Veränderungen an den Chondriosomen und Leukoplasten	360
IV. Die UV-Absorption des Thioharnstoffes	361
Besprechung der Versuche	365
Zusammenfassung	369
Literatur	372

¹ Research carried out with the support of the International Atomic Energy Agency.

Einleitung

Untersuchungen über prophylaktischen Strahlenschutz durch vor der Bestrahlung dargebotene chemische Stoffe und durch therapeutische Behandlungen nach erfolgter Bestrahlung sind heute zu einem zentralen Gebiet strahlenbiologischer Forschung geworden. Diese Fragen sind nicht nur wegen der steigenden Verwendung ionisierender Strahlen in Biologie, Medizin, Landwirtschaft und Technik von größter praktischer Bedeutung, sondern auch für die theoretische Erforschung der primären Strahlenwirkung in der lebenden Substanz von hohem Interesse. Eine erste lehrbuchmäßige Zusammenstellung dieses Fragenkomplexes geben Bacq und Alexander (1958).

Die unmittelbare physikalische Wirkung ionisierender Strahlen besteht in Ionisationen und Anregungen der getroffenen Atome. Im ersten Fall wird durch die einstrahlende Energie ein Elektron aus der Atomhülle herausgeschlagen, wodurch das Atom zu einem positiv geladenen, reaktionsfähigen Ion wird, im zweiten wird ein Elektron auf eine Quantenbahn mit höherem Energieniveau gehoben. Auch angeregte Moleküle können zerfallen (wie etwa das Wassermolekül in freie Radikale) und damit, ebenso wie die Ionisation, die Voraussetzung für chemische Änderungen schaffen, die dann ihrerseits zu physiologischen, morphologischen oder, bei entsprechender Intensität, zu letalen Veränderungen führen können (vgl. Gordon 1957, Kusin 1957, Maurer 1958, Fritz-Niggli 1959).

Die klassische Treffertheorie zog im wesentlichen nur die durch Ionisation oder Anregung unmittelbar betroffenen Atome oder Moleküle in Betracht. Diese durch direkte Treffer in der Materie hervorgerufenen Veränderungen sind, außer durch physikalische Abschirmung, nicht zu verhindern und irreversibel. Die in der Zelle bzw. im Organismus zu beobachtenden biologischen Strahlenwirkungen lassen sich aber meist nicht allein durch derartige Treffer in besonders lebenswichtige Molekülverbände erklären, wie dies etwa bei strahleninduzierten Genmutationen möglich ist. Schon Chromosomenbrüche werden heute vielfach nicht mehr auf direkte „Treffer“ zurückgeführt, sondern auf chemische und physikalisch-chemische Veränderungen der Desoxyribonukleinsäure (DNS) in den Chromosomen. Auch Mitosehemmungen werden durch strahlenbedingte Stoffwechselstörungen im Zellkern erklärt (Maurer 1959).

Der weitaus größere Teil der Strahlentreffer erfolgt aber auch nicht in solchen hochkomplizierten, lebenswichtigen Molekülverbänden, sondern in der wässrigen Phase des Protoplasmas, wo sie zur Bildung von freien Radikalen, Peroxyden und hochaktiven Ionen führen. Diese aber sind in der Lage, Enzyme anzugreifen oder normale Reaktionsabläufe entscheidend zu beeinflussen und dadurch biologische Wirkungen auszulösen. Freie, nach Röntgenbestrahlung entstandene Radikale wurden auch schon in Pflanzen, z. B. in Gerstenkörnern (Zimmer, Ehrenberg und Ehrenberg 1957) und in Samen von *Vicia faba* (Klingmüller und Saxena 1959) nachgewiesen.

Über den Wirkungsmechanismus der bisher aufgefundenen Schutzstoffe

kann nichts Allgemeingültiges ausgesagt werden. Es sind of recht heterogene Stoffe, die eine Schutzwirkung ausüben, während chemisch nahe verwandte Stoffe sich in ihrer Schutzwirkung unterscheiden. Es wird daher angenommen, daß es verschiedene Möglichkeiten der Schutzstoffwirkung gibt. Bei den einen steht die Eigenschaft leicht oxydierbar zu sein im Vordergrund, wodurch die intrazelluläre Sauerstoffspannung erniedrigt wird, bei anderen ihre Fähigkeit für den normalen Stoffwechsel gefährliche Radikale zu binden, die dritten gehen vielleicht eine reversible Verbindung mit einem Rezeptor ein und heben dadurch dessen Reaktionsfähigkeit gegenüber den freien Radikalen auf (z. B. Verbindung mit der prosthetischen Gruppe eines Enzyms) usw. Auch auf die Blockierung der Oberfläche von Mitochondrien, z. B. durch Färbung mit Berberinsulfat, wurden Strahlenschutzeffekte zurückgeführt (Meisel et al. 1959).

Die meisten Untersuchungen über die Wirkung chemischer Strahlenschutzstoffe wurden bisher an Tieren (Mäusen, Ratten, Meerschweinchen) bzw. tierischen Geweben ausgeführt (neuere Zusammenfassungen: Pany 1957, Hollaender et al. 1958, Langendorff 1958).

Aber auch an pflanzlichen Objekten konnte die Wirksamkeit chemischer Strahlenschutzstoffe festgestellt werden, so an Bakterien (Hollaender und Stapleton 1953, 1956: Schutz durch Cysteamin, Langendorff, Koch und Hagen 1955 u. a.), Pilzporen (Kølmærk 1958), Hefen (Meisel et al. 1959) oder an Wurzelspitzen von *Allium cepa* (Riley 1952, Forssberg und Nybom 1953: durch Cystein), *Tradescantia* (Mikaelsen 1954: Schutz durch Cystein und NaCN) und *Vicia faba* (Wolff 1954: Schutz durch 2,3-Dimercaptopropanol). Bei den drei letztgenannten Objekten wurden Mitoserate und Zahl von Chromosomenaberrationen als Test herangezogen.

Durch vierstündige Vorbehandlung keimender Erbsen (*Pisum sativum*) mit einer 1/4000 NaCN-Lösung konnte die das Wurzelwachstum hemmende Wirkung einer 350 r-Röntgenbestrahlung vermindert werden (Bacq und Herve 1951, zit. und Abb. in Bacq und Alexander 1958). Einen ähnlichen Schutzeffekt konnten Maurer und Schreiber (1959) nach 30 Minuten Vorbehandlung mit 2‰ Cysteaminlösung an röntgenbestrahlten Wurzeln von *Vicia faba* erzielen.

Eine Schutzwirkung durch Nachbehandlung mit Schutzstoffen wurde an *Vicia faba* beobachtet, deren Samen trocken bestrahlt (Röntgenstrahlen, 3000 r bei Dosisleistung von 600 r/min, 200 kV und 0,5 mm Cu) und nachher zwei Stunden in von der Cronacher Nährlösung + 5% wäßriger Cysteinlösung (1:1) gequollen und hierauf in reiner Nährlösung weiterkultiviert wurden (Kräke, Künkel und Schmermund 1957, und Künkel und Schubert 1959). Cysteinamin hatte die gleiche Wirkung.

Damit stimmt eine Beobachtung der drei erstgenannten Autoren überein, wonach auch an Siebenschläfern, die im Zustand des Winterschlafes bestrahlt worden waren, drei Wochen nach der Bestrahlung eine volle Schutzwirkung durch Cystein erreicht werden konnte. Hier ist wohl anzunehmen, daß die bei der Bestrahlung entstandenen Ionisationsprodukte erst wirksam zu werden beginnen, wenn die Lebensfunktionen wieder voll in Gang gesetzt wer-

den, so daß eine Verabreichung von chemischen Schutzstoffen erst zu diesem Zeitpunkt auch noch schädliche Reaktionsabläufe zu verhindern vermag. Im allgemeinen wird man aber als feststehend annehmen dürfen, daß die Wirksamkeit der Schutzstoffe an ihr Vorhandensein im Protoplasma zum Zeitpunkt der Bestrahlung gebunden ist. Daß nämlich auch bei trocken bestrahlten Samen eine nachfolgende Behandlung mit Schutzstoffen nicht unter allen Versuchsbedingungen zum Erfolg führt, zeigen Versuche von Klingmüller (1959), der bei trocken bestrahlten und anschließend mit Cystein und Cysteamin behandelten Samen von *Vicia faba* keine Schutzwirkung finden konnte.

Untersuchungen an Dauergewebszellen höherer Pflanzen, etwa Blatt- oder Stengelepidermen, wurden bisher noch nie durchgeführt. Aber gerade die Pflanzenzelle, die infolge ihrer Größe und Differenzierung nicht nur die Bestimmung der tödlichen Strahlendosis, sondern auch die Beobachtung verschiedenster strahlenbedingter Veränderungen im Protoplasma, im Zellkern und an den Plastiden und Chondriosomen erlaubt, erscheint für die Untersuchung der Wirkung von Strahlenschutzstoffen besonders vielversprechend (Biebl 1960 a).

Pflanzliche Dauergewebszellen wurden daher als Objekt vorliegender Untersuchung gewählt.

Als Strahlung wurden in den meisten bisher über die Wirkung chemischer Strahlenschutzstoffe veröffentlichten Arbeiten Röntgen- oder Gammastrahlen benützt. Diese beiden Strahlenarten sind für Untersuchungen an erwachsenen, vegetativen Pflanzenzellen wenig geeignet. In eigenen Versuchen konnten durch 100.000 r Röntgenbestrahlung und nach Wanner (1945) durch 48.000 r im Cytoplasma von Außenepidermiszellen der Zwiebelschuppe von *Allium cepa* keine mikroskopisch zu erfassenden Effekte erzielt werden. Um an dem genannten Objekt unmittelbar durch Vitalfärbung nachweisbare Plasmaschädigungen zu erhalten, erwiesen sich Röntgenbestrahlungen mit 120.000 bis 800.000 r notwendig (Strugger, Krebs und Gerlach 1953). Auch Dauerbestrahlung mit Gammastrahlen des Co^{60} bewirkt in vegetativen Zellen verschiedenster Pflanzen keine mikroskopisch durch Plasmolyse- oder Vitalfärbungsversuche erkennbaren Veränderungen (Biebl 1956).

Wesentlich größere Empfindlichkeit gegen Röntgenstrahlen besitzen allerdings embryonale und teilungsfähige Zellen, aber auch diese nur in ganz bestimmten Entwicklungsstadien, z. B. bestimmten Phasen während der Keimung (Lit. bei Biebl und Pape 1951, Biebl 1958, 1959 a, b) oder in bestimmten teilungsfähigen Geweben, wie den Nodien von *Tradescantia* (Biebl 1959, 1960 b). Hier sind durch einmalige Röntgendosen zwischen 250–500 r schon deutliche, im weiteren Entwicklungsverlauf sichtbar werdende Effekte zu erreichen. Diese Zellen sind aber wiederum so klein, daß sie sich für zellphysiologische Untersuchungen nicht eignen.

Wir haben daher in unserer ersten Untersuchung über chemischen Strahlenschutz an Pflanzenzellen kurzwellige ultraviolette Strahlen ($< 310 \text{ m}\mu$) einer Quecksilberdampflampe zur Erzielung der Strahlenschädigung verwendet. Über die Art der schädigenden Wirkung dieser

Strahlen auf Zellen von Meeresalgen (Biebl 1952), von Laub- und Lebermoosen (Biebl 1954) sowie auf Zellen der Epidermis der Zwiebelsschuppen von *Allium cepa* (Biebl 1942 a, b, Glubrecht 1935, Toth 1949, Seemann 1950, Biebl und Url 1958) lagen uns reichlich Erfahrungen vor. Diese Strahlen können bei einer Brennerentfernung von ca. 20 cm schon nach 15 Sekunden Einwirkung nachweisbare Veränderungen im Protoplasma bewirken und nach 45 Sekunden Einwirkung zum Zelltod führen.

Die Verwendung kurzwelliger UV-Strahlen war aber auch deshalb von Interesse, um festzustellen, wie weit deren Wirkung überhaupt mit jener ionisierender Strahlen von der Art der Röntgen- oder Gammastrahlen zu vergleichen ist. Nach Lea (1946) und Gray (1955, zit. nach Fritz-Niggli 1959) kann nach Untersuchungen an Viren und Bakterien die Anregung als Ursache des biologischen Effektes im Vergleich zur Ionisation vernachlässigt werden. Die Energie der kurzwelligen UV-Strahlen reicht aber im wesentlichen nur zu Anregungen in der getroffenen Materie aus.

Daß aber auch durch Anregungen hochaktive Ionen, Radikale und Peroxyde entstehen können, ist bekannt. *In vitro* wurden als Folge von Bestrahlung mit kurzwelligem UV schon zahlreiche derartige Zerlegungen nachgewiesen (Zusammenfassung bei Livingston 1955).

Es ist auch gelungen, ähnlich wie bei den ionisierenden Strahlen, die Wirkung kurzwelliger UV-Bestrahlung auf chemischem Weg zu beeinflussen und gewisse Schutzwirkungen zu erzielen (Zusammenfassungen bei Simonis 1954, 1955, 1956, Simonis und Glubrecht 1957). So konnten Schutzwirkungen beobachtet werden nach Entfernung von Sauerstoff während der UV-Bestrahlung, wodurch der Ablauf oxydativer Prozesse vermindert wird (R. B. Mefferd jr. und T. S. Matney 1952) oder durch SH-Gruppen tragende Verbindungen wie Cystein und Glutathion, durch die Oxydationen verhindert oder oxydierte SH-Enzyme oder andere Proteine mit SH-Gruppen wieder reduziert werden (Calcutt 1950, Giese u. Mitarb. 1955). Ferner konnte eine Verminderung der UV-Wirkung erreicht werden durch Zugabe von Stoffwechselprodukten, wie Brenztraubensäure (Heinmets, Taylor und Lehman 1954), durch Enzymhemmstoffe wie Natriumazid (Berger u. Mitarb. 1953) oder durch Zusatz von Katalase, von der angenommen wird, daß sie die durch indirekte Strahlenwirkung gebildeten organischen Peroxyde wieder abbaut.

Giese und Mitarb. (1955) geben eine kritische Übersicht über die hinsichtlich der Peroxydwirkung bestehenden Arbeiten und kommen auf Grund dieser und eigener vergleichender Untersuchungen über die Wirkung von UV-Strahlen und von H_2O_2 auf das Protozoon *Colpidium colpoda* und auf Spermien des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* zu dem Schluß: „Enough difference in action between UV and peroxyde exists to cast doubt on interpreting UV-action by peroxyde formation. Enough similarity exists in their action on some biological phenomena to make further pointed experiments desirable.“

Für unsere Strahlenschutzversuche an Pflanzenzellen haben wir als erste Substanz Thioharnstoff gewählt. Er zählt zu den am längsten be-

kannten Schutzstoffen gegen die indirekte Wirkung ionisierender Strahlen. Über seine Wirkungsweise schreibt Koch (1958): „Nach den Untersuchungen von Dale (1952), Cole, Fishler und Bond (1953), Rosen, Brohult und Alexander (1957) sowie Kusin (1957, H. 5) kann der Thioharnstoff in vitro als Akzeptor der unter der Bestrahlung entstehenden OH-Radikale angesehen werden. Ob dasselbe auch für die Verhältnisse in vivo gilt, scheint fraglich. In den Experimenten von Mikaelson (1955) mit *Tradescantia* ist es vorstellbar. Jedoch fällt bei Tierversuchen, worauf vor uns (Langendorff, Koch und Hagen 1954) schon Haley und Mitarbeiter (1951) hingewiesen worden ist, auf, daß ein Schutzeffekt des Thioharnstoffes erst im toxischen Dosenbereich erzielt wird. In weiteren Untersuchungen haben wir es äußerst wahrscheinlich gemacht, daß der toxische Effekt des Thioharnstoffes für seine Strahlenschutzwirkung verantwortlich ist (Langendorff, Koch und Hagen 1954 a, b). Nach Applikation einer für den Strahlenschutz notwendigen Dosis entwickeln sich bei Ratten und Mäusen sehr schnell Lungenveränderungen im Sinne eines Lungenödems, besser einer Pneumonose (Koch 1955). Diese reichen vollständig aus, um den Thioharnstoffeffekt im Sinne einer Sauerstoffmangelwirkung zu erklären. Das heißt, durch Minderung der Gasaustauschvorgänge in der Lunge kommt es zum Absinken des Sauerstoffpartialdruckes in den Geweben und damit zu einem Anstieg der Strahlenresistenz.“

Diese Darstellung zeigt, wie kompliziert und schwer durchschaubar die Strahlenschutzwirkung des Thioharnstoffes im tierischen Organismus ist. Dem gegenüber liegen die Verhältnisse in einem einschichtigen, großzelligen Pflanzengewebe unvergleichlich einfacher. Hier kann die Schutzwirkung des Thioharnstoffes direkt an der einzelnen Zelle beobachtet und durch verschiedene Versuchsanstellungen variiert werden.

Ein wichtiger Faktor kommt gegenüber den ionisierenden Strahlen im engeren Sinn des Wortes bei der Untersuchung der Schutzwirkung gegen kurzwellige UV-Strahlen aber noch hinzu. Und das ist die rein physikalische Absorption dieser Strahlen durch die verwendeten Schutzstoffe. Diese kann bei manchen Substanzen, auch bei Verwendung sehr verdünnter Lösungen, überraschend groß sein und die Entscheidung schwer machen, wie weit eine erzielte Schutzwirkung durch „konkurrierende Absorption“ oder durch chemische Reaktionen im Plasma zustande kommt.

Vorliegende Arbeit wird sich daher in vier Teile zu gliedern haben: 1. Die Wirkung der UV-Strahlen auf die unbehandelten Zellen, 2. die Wirkung des Thioharnstoffes auf die unbestrahlten Zellen, 3. die Wirkung des Thioharnstoffes als Schutzstoff in der UV-bestrahlten Zelle und 4. die UV-Absorption des Thioharnstoffes.

Material und Methode

Als Hauptversuchsobjekt wurde die Innenepidermis der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* gewählt. Sie gehört zu den meist untersuchten und bestbekannten zellphysiologischen Objekten. Für eine Reihe von Vergleichsversuchen wurden auch die Außenepidermis der Zwiebelschuppe sowie Epi-

dermiszellen der Mittelrippe der Blattunterseite von *Rhoeo discolor* und des Rotkohls (*Brassica oleracea*) herangezogen.

Die Präparation der Innenepidermis der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* erfolgte nach der von Strugger (1949) empfohlenen Methode. Den für die Bestrahlung nötigen Schnittgrößen entsprechend wurden die äußersten fleischigen Zwiebelschuppen (2.—3.) in etwa 1½ cm breite Sektoren zerlegt und die ursprünglich noch festanliegenden, aus einer einzigen Zell-Lage bestehenden Innenepidermen mittels einer Rasierklinge zu etwa 5 mm breite Querstreifen eingeschnitten. Diese so vorbereiteten Zwiebelschuppen wurden hierauf in einem weithalsigen Fläschchen in Leitungswasser mittels einer Wasserstrahlpumpe entlüftet bzw. mit Wasser infiltriert. Nach dieser Behandlung lassen sich die rechteckigen Epidermisstücke ohne jede Schädigung von der Zwiebelschuppe abheben.

Diese Schnitte wurden hierauf als Kontrolle auf Leitungswasser bzw. zur Vorbehandlung mit dem Strahlenschutzstoff auf verschiedenen konzentrierte Thioharnstofflösungen schwimmend aufgelegt. Ein Untertauchen der Schnitte bringt die Gefahr des Einrollens mit sich und zeitigt auch keine anderen Ergebnisse.

Zur Bestrahlung wurden die Schnitte auf einer Glasplatte entweder auf eine mit Wasser (Kontrolle) oder auf eine mit der Thioharnstofflösung getränkte vierfachte Filterpapierlage mit den Schmalseiten nebeneinander aufgelegt und durch ein quer darübergelegtes Schott WG₅-Filter zur Hälfte abgedeckt. Durch zeitlich abgestuftes Darüberschieben einer schwarzen Platte konnten die Schnitte einer Serie verschieden lang bestrahlt werden. Die bestrahlte Seite wurde durch Abschneiden einer Ecke markiert. Während der Bestrahlung erhielten die Schnitte nur durch ihre Unterseite Feuchtigkeit aus dem Filterpapier. Die Oberseite wurde vor der Bestrahlung stets mit einem Filterpapier sorgfältig abgesaugt, so daß keine oberhalb der Zelle befindliche Thioharnstoffschichte die Strahlenwirkung zusätzlich abschirmen konnte.

Angaben über die Methodik der Transmissionsmessungen und der Küvettenfilterversuche finden sich im Abschnitt IV.

Da die durch das WG₅-Filter abgedeckten Hälften auch nach den längsten angewandten Bestrahlungszeiten noch keinerlei Schädigung zeigten, können die auf den vollbestrahlten Hälften beobachteten Veränderungen der Wirkung der UV-Strahlung kürzer als 310 m μ zugeschrieben werden.

Als Strahlenquelle diente eine Astralux-Quarzanalysenlampe mit einem geraden Hochdruckquarzbrenner (AS 300) aus 23 cm Entfernung bei normaler Netzspannung von 220 Volt. Kontrollmessungen ergaben allerdings, daß meist nur eine Spannung von 205 Volt oder etwas darüber gegeben war. Das Spektrum des verwendeten AS-300-Brenners zeigt bei etwa 225 m μ eine unterste, ganz schwach erkennbare Emissionslinie. Das Ergebnis von Filterversuchen zeigt aber, daß, biologisch nachweisbar, von dem Quarzbrenner auch noch kürzerwellige Strahlen ausgesendet werden.

Die mikroskopische Untersuchung wurde mit einem Zetopan-Mikroskop der Firma Reichert mit Anoptralkontrast und Dunkelfeld ausgeführt. Beobachtet wurde im allgemeinen 24 Stunden nach der Bestrahlung.

I. Die Wirkung der UV-Strahlen auf die unbehandelten Zellen

Vor Beginn der Versuche über die Wirkung von chemischen Strahlenschutzstoffen war es notwendig, sowohl die Resistenz wie auch zytomorphologisch und zellphysiologisch erfaßbare Folgen der UV-Bestrahlung an den nicht vorbehandelten Objekten zu untersuchen.

Für die Epidermen der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* konnten alle älteren Beobachtungen einwandfrei bestätigt werden (Biebl 1942 a, b, Toth 1949, Seemann 1950, Biebl und Url 1958).

Als in ihrer Resistenz gegen UV-Strahlen ($< 310 \text{ m}\mu$) am gleichmäßigsten erwies sich wiederum die zarte Innenepidermis der Zwiebelschuppe. Sie zeigt unter den oben angegebenen Versuchsbedingungen 24 Stunden nach der Bestrahlung mit großer Regelmäßigkeit nach 45 Sekunden Bestrahlung ein teilweises und nach 1 Minute Bestrahlung ein vollständiges Absterben. Gelegentlich war in einem Versuch die Lebensgrenze um eine Zeitstufe nach oben, ganz selten auch nach unten verschoben.

Die Außenepidermen der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* zeigen hingegen bei verschiedenen Zwiebeln und auch bei verschiedenen Schuppen derselben Zwiebel größere Resistenzunterschiede. Diese dürften in erster Linie auf die verschiedene Dicke der bei der Bestrahlung der Strahlenquelle zugewandten Epidermisaußenwand zurückzuführen sein. So lag z. B. in einem gegebenen Fall die Todesgrenze der Epidermis der von außen 1. Schuppe (äußere Zellwand $7-8 \mu$ dick) bei 4 Minuten, in der 3. Schuppe (Zellwanddicke 6μ) bei 3 Minuten und in der innersten, 6. Schuppe (Zellwanddicke 5μ) bei 2 Minuten Bestrahlung (Biebl 1942 a). Sogar das immer wieder zu beobachtende unregelmäßige Absterben der bestrahlten Zellen innerhalb eines Schnittes wird zumindest zum Teil durch eine verschiedene Membrandicke zu erklären sein. Toth (1949) hat Querschnitte durch die Außenepidermis einer Zwiebelschuppe hergestellt und in 33 aufeinanderfolgenden Zellen bei einer durchschnittlichen Zellwanddicke von $12,2 \mu$ Schwankungen von $7,5 \mu$ bis zu 17μ feststellen können.

Eine schützende Wirkung der Epidermisaußenwand, insbesondere der Kutikula, gegen UV-Strahlen wurde auch von verschiedenen anderen Autoren angenommen (Stahl 1909, Kluyver 1911, Ursprung und Blum 1917, Meindl 1934, Wuhrmann-Meyer 1941 u. a.).

Diesen verschiedenen Zellwanddicken der Außenepidermis steht bei den Innenepidermen der Zwiebelschuppen eine sehr gleichmäßige Membrandicke von etwa 4μ gegenüber. Die Innenepidermen zeigen daher auch in den verschiedenen Zwiebelschuppen und bei verschiedenen Zwiebeln eine sehr gleichmäßige UV-Resistenz.

Hölzl und Bancher (1959) beobachteten in den flavonhaltigen Vakuolen von Außenepidermen gelber Zwiebelsorten starke Absorptionen im langwelligen UV ($300-400 \text{ m}\mu$) und vermuten, daß ähnliche Absorptionen auch im kurzwelligen UV-Bereich erfolgen und diese zumindest für den darunterliegenden Plasmawandbelag einen Schutz bedeuten. Sie weisen dabei auch auf eine ältere Beobachtung, wonach anthokyangefärbte

Zwiebel-Innenepidermiszellen, wie sie in roten Zwiebeln gelegentlich vorkommen, eine größere Resistenz gegen kurzwelliges UV besitzen als ungefärbte Zellen (Biebl 1943). Die Autoren meinen, daß Unterschiede im Flavongehalt und der Schichtdicke der Vakuolen in den Außenepidermen der Zwiebel die zu beobachtende Streuung zwischen verschiedenen Schuppen und Zwiebelsorten erklären könne. Daß derartige UV-Absorptionen im Zellsaft auf die Strahlenwirkung Einfluß nehmen können, wird auch bei

Tabelle 1. *UV-Resistenz verschiedener Epidermen (24 Stunden nach der Bestrahlung).*

1 = lebend, -1 = einige Zellen tot, \pm = teilweise abgestorben, + = tot.

Objekt	Dicke der Epidermisaußenwand	Bestrahlungsdauer in Minuten											
		¼	½	¾	1	1½	2	2½	3	3½	4	5	6
Allium cepa, Innenepidermis	3-4 μ	1	1	\pm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Allium cepa, Außenepidermis	10,3 μ	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	\pm	+	+
Rhoeo discolor, Blattunterseite	2,5-3 μ	1	1	1	\pm	+	+	+	+	+	+	+	+
Rotkohl, Blattunterseite	4-6 μ	1	1	1	1	1	-1	\pm	+	+	+	+	+

Eigenabsorption von chemischen Strahlenschutzstoffen nicht übersehen werden dürfen, wenn auch anzunehmen ist, daß die wesentliche Schädigung der Zelle von der UV-Strahlung abhängt, welche die oberhalb der Vakuole

Tabelle 2. *Allium cepa, Innenepidermis. Abhängigkeit der UV-Strahlenwirkung von der Entfernung der Strahlenquelle (24 Stunden nach der Bestrahlung).*

Entfernung von der Strahlenquelle	Bestrahlungsdauer in Minuten							
	¼	½	¾	1	1½	2	2½	3
19,6 cm	1	\pm	+	+	+	+	+	+
23,0 cm	1	1	1	+	+	+	+	+
26,6 cm	1	1	1	1	1	+	+	+

gelegene, direkt der Strahlenquelle zugewandten und von ihr nur durch die Zellwand getrennte Plasmaschicht trifft.

Wenn auch keineswegs angenommen werden soll, daß die Dicke der Epidermisaußenwand bzw. ihrer Kutikula der einzige Grund für das verschiedene Resistenzverhalten der Epidermiszellen verschiedener Pflanzen ist und daß nicht daneben auch wesentliche plasmatische Resistenzunterschiede gegeben sein können, so zeigt sich doch bei unseren vier Objekten eine recht gute Beziehung zwischen UV-Resistenz und Dicke der äußeren Zellwand (Tab. 1).

Wichtig für die Vergleichbarkeit verschiedener Versuche ist eine genaue Einhaltung des gleichen Abstandes von der Strahlenquelle. Wie stark sich die biologische Strahlenwirkung mit der Entfernung von der Strahlenquelle

ändert, zeigt Tab. 2. Für unsere Versuche wurde daher einheitlich eine Entfernung von 25 cm gewählt.

Die Todesbilder der durch UV-Strahlen getöteten Zellen sind nicht besonders kennzeichnend. Die toten Zellen der Zwiebelchuppen-Innenepidermen zeigen ein koaguliertes, manchmal etwas abgehobenes Protoplasma. Die Zellkerne sind rund, scharf konturiert, stark lichtbrechend und häufig von einem kreisrunden Hof im koagulierten Plasma umgeben. Zur Untersuchung der Außenepidermen wurden stets rote Zwiebeln verwendet, deren Außenepidermiszellen einen anthokyangefärbten Zellsaft enthalten. Das gleiche war der Fall bei den Epidermen der Blattunterseite von *Rhoeo discolor* und des Rotkohls (*Brassica oleracea*). Bei allen drei Objekten ist der Eintritt des Zelltodes infolge Verlustes der Semipermeabilität des Protoplasmas mit einem Austritt des rotgefärbten Zellsaftes und damit einem Ausbleichen der toten Zellen verbunden. Das tote Plasma ist wiederum koaguliert, die Zellkerne treten, meist etwas bräunlich verfärbt, deutlich hervor. Beim Rotkohl ist die etwas größere Strahlenempfindlichkeit der um die Spaltöffnungen gelegenen Nebenzellen von protoplasmatisch-anatomischem Interesse. Sie sterben meist um eine Bestrahlungsstufe früher ab als die übrigen Epidermiszellen.

Die plasmatischen Veränderungen in den absterbenden, ja auch in den mit subletalen Dosen bestrahlten Zellen sind hingegen sehr charakteristisch.

Hinsichtlich der UV-Strahlenwirkungen auf die Zellen der Innenepidermis der Zwiebelchuppen von *Allium cepa* darf im einzelnen wieder auf die älteren Arbeiten (Biebl 1942 a, b, Biebl und Url 1958) verwiesen werden.

Die Plasmaströmung ist 24 Stunden nach 2 und 5 Sekunden Bestrahlung noch normal stark und kräftig. Nach 10 Sekunden Bestrahlung ist sie schon deutlich gehemmt und nach 30 Sekunden Bestrahlung meist vollkommen sistiert, doch sind die Zellen in diesem Zustand noch bestens plasmolisierbar. Die 45 Sekunden bestrahlten Zellen sind in dieser geschilderten Versuchsreihe zum größten Teil tot.

Die Wasserpermeabilität wird durch die Bestrahlung erhöht. Dies äußert sich in einem früheren und schnelleren Plasmolyseeintritt in den bestrahlten Zellen gegenüber jenen der durch das WG₅-Filter abgedeckten Hälfte desselben Schnittes. Auch dies ist schon nach subletalen Bestrahlungszeiten von 15 und 30 Sekunden sehr deutlich, und zwar sowohl unmittelbar nach der Bestrahlung wie auch nach tagelangem Liegen in Wasser.

Die Viskosität des Plasmas wird durch die Bestrahlung herabgesetzt. Die mit subletalen Dosen bestrahlten Zellen zeigen nämlich nicht nur infolge des beschleunigten Wasseraustrittes in einer hypertonen Lösung einen schnelleren Plasmolyseeintritt, sondern auch schnellere bikonvexe Rundung des abgehobenen Protoplasten. In den durch das WG₅-Filter abgedeckten Kontrollhälften bleiben die Protoplaste wesentlich länger konkav und an den Schmalseiten zipfelig ausgezogen.

Die Zellkerne scheinen gegenüber dem Cytoplasma durch größere

Strahlenempfindlichkeit ausgezeichnet zu sein. Im Dunkelfeld kann man in den absterbenden Schnitten häufig die Zellkerne schon zu einem Zeitpunkt aufleuchten sehen, zu dem die Zellen noch plasmolysierbar sind.

Der Tonoplast, die innere Plasmagrenzschicht, die die Zellsaftvakuole umschließt, erweist sich hingegen als resistenter als das übrige Cytoplasma und behält länger seine Semipermeabilität. Ein Stadium des Absterbeverlaufes ist dadurch ausgezeichnet, daß in einer hypertonen Lösung (z. B. 0,7 KCl) nur noch Tonoplastenabhebungen auftreten, während das übrige Protoplasma bereits abgestorben und koaguliert ist (Abb. 1).

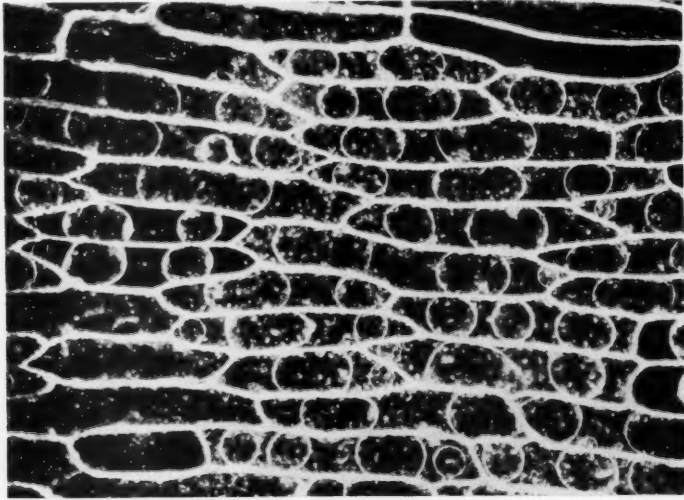


Abb. 1. *Allium cepa*, Innenepidermis, 24 Stunden nach 1 Minute UV-Bestrahlung. Bis auf zwei lebende, plasmolysierte Zellen (links, Mitte) durchwegs Tonoplastenplasmolysen (in 0,7 KCl).

Die Chondriosomen, Leukoplasten und Sphärosomen zeigen verschiedenes Verhalten. Während die Chondriosomen und Leukoplasten schon auf schwächste, subletale Bestrahlungen mit einer Abrundung reagieren, sind die Sphärosomen sogar im koagulierten Plasma der toten Zellen noch unverändert als im Dunkelfeld hell aufleuchtende Kügelchen erhalten.

Die Permeabilitätsverhältnisse der Außenepidermis der Zwiebelsschuppen von *Allium cepa* wurden besonders von Toth (1949) eingehend untersucht. Es sei als guter Test subletaler UV-Strahlenwirkung vor allem die schon von Biebl (1942 b) beschriebene Hemmung der Glycerinpermeabilität genannt. Schon unmittelbar nach der Bestrahlung deplasmolysieren die in 0,7 mol Glycerin plasmolysierten Schnitte in ihren voll bestrahlten Hälften langsamer als in den durch WG_3 abgedeckten Kontrollhälften. Nach 24 Stunden erhöht sich diese Permeabilitätshemmung in den subletal

bestrahlten, ansonsten vollkommen frisch und gesund aussehenden Zellen auf das Fünffache (Toth 1949).

Bei Verwendung einer 1,0 mol Glycerinlösung dauert 24 Stunden nach der Bestrahlung die Deplasmolyse in den vollbestrahlten Zellen viele Stunden, wenn sie überhaupt erreicht wird. In den abgedeckten Kontrollhälften kommt es nach dieser Zeit, wahrscheinlich durch die lange Wässerung, auch zu einer gewissen Hemmung der Glycerinpermeabilität, doch ist die Deplasmolyse nach etwa 1 Stunde vollständig erreicht, während die vollbestrahlte Hälfte nach dieser Zeit noch durchwegs starke bikonvexe Plasmolysen zeigt.

Die Reihenfolge der Wirkungen Hemmung der Plasmaströmung, Einstellen der diese noch eine zeitlang fortsetzenden BMB, Veränderungen am Zellkern und schließlich Veränderungen am allmählich absterbenden Cytoplasma wurde auch von Glubrecht (1953) am gleichen Objekt bei verschiedener monochromatischer UV-Bestrahlung zwischen 254 und 303 m μ beobachtet.

II. Wirkung des Thioharnstoffes auf die unbestrahlte Zelle

1. Resistenz gegen Thioharnstoff

Um die für Strahlenschutzversuche geeigneten Konzentrationen des Thioharnstoffes zu ermitteln, wurde vorerst die Resistenz unserer Objekte gegen Thioharnstoff bestimmt.

Daß Thioharnstoff in hypertonischen Konzentrationen wesentlich schädlicher für die Pflanzenzellen ist als Harnstoff, ist schon durch die Untersuchungen von Höfler (1939) bekannt geworden: „Die Protoplasten der Stengelhautzellen von *Gentiana Sturmi* oder *Gentiana germanica*, die für Harnstofflösungen rapid durchlässig sind, sind gleichwohl gegen den Harnstoff in hohem Grad resistent. Sie können in der anfangs hypertonischen Lösung von 1,0 oder 1,2 mol nach dem Plasmolyserückgang tagelang und, in Wasser zurückgebracht, wochenlang am Leben bleiben.“ Bringt man die gleichen Zellen in eine hypertonische Lösung von 1,0 bis 1,5 mol Thioharnstoff, so tritt zuerst auch normale Plasmolyse ein, doch schon nach 1½ bis 2 Minuten dehnen sich die Protoplaste wieder aus. Dabei bilden sich, ähnlich der bekannten Kappenplasmolyse in Alkalisalzen (Höfler 1928, 1934) beiderseits des von Anthokyan rot gefärbten Zellsaftraumes durch Quellung des Plasmas farblose Kappen aus. „Beobachtet man solche Zellen weiter, so sieht man oft, daß die äußeren Konturen der Protoplasten sich rasch vorschieben, wodurch die Kappen an Breite zunehmen, während gleichzeitig die ebenfalls halbkugeligen Tonoplastenkonturen am Platz bleiben oder sich nur wenig bewegen.“ Wahrscheinlich infolge Verfestigung des Tonoplasten unter der Einwirkung des Thioharnstoffes und des in der Vakuole zunehmenden Druckes kommt es kurze Zeit später zu einem Platzen der Tonoplasten und damit einem Absterben der Zellen.

„Die äußere Hautschicht wird offenbar vom Sulfoharnstoff viel leichter passiert als der Tonoplast. Mit anderen Worten, die Intrabilität der Stengel-epidermiszellen von *Gentiana* ist auch für den Sulfoharnstoff viel größer als die Permeabilität.“ Dieser Befund Höflers (1939) wird für die Er-

klärung der schnellen Schutzwirkung des Thioharnstoffes in unseren Strahlenschutzversuchen noch von Bedeutung werden bzw. seine Bestätigung finden.

Wir prüften die Thioharnstoffresistenz unserer Versuchsobjekte nach einer in zahlreichen Untersuchungen über chemische Resistenz pflanzlicher Protoplasmen bewährten Methode (Biebl 1947). Die Schnitte wurden in abgestufte Konzentrationen von 0,01 bis 1,0 mol Thioharnstoff eingelegt und 48 Stunden später auf ihren Lebenszustand durchgesehen. In 1,0 mol Thioharnstoff waren sämtliche geprüfte Objekte (*Allium cepa*, Innen- und Außenepidermen der Zwiebelschuppen, *Rhoeo discolor* und Rotkohl, Blattunterseite sowie Blättchen einiger Moose wie *Bryum capillare*, *Scapania aspera*, *Bazzania trilobata*, *Hookeria lucens*) abgestorben. In 0,1 mol lebten alle. Um 0,5 bis 0,4 mol lagen die Todesgrenzen.

Tabelle 3. Thioharnstoffresistenz der Innenepidermis einer Zwiebelschuppe von *Allium cepa* (48 Stunden Einwirkungsdauer).

Objekt	Thioharnstoff in mol							
	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
<i>Allium cepa</i> , Innenepidermis	1	1	1	1	1	—1	+	+
2. Schuppe von außen								

Die Hauptversuche hinsichtlich der Thioharnstoffwirkung wurden, wie auch später die über seine Strahlenschutzwirkung, mit Innenepidermen der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* durchgeführt. Verwendet wurde meist die 3. Schuppe von außen. Der osmotische Wert dieser Zellen in einem bestimmten Versuch entsprach 0,4 mol Traubenzucker, d. h. in 0,3 mol Traubenzucker keine Plasmolyse, in 0,4 mol in einem Teil der Zellen schwache Grenzplasmolyse, in 0,5 mol in allen Zellen Plasmaabhebungen. Der in diesem Versuch festgestellte osmotische Wert gilt aber nicht allgemein für alle Zwiebeln und auch nicht für alle Schuppen einer Zwiebel. Schon seit Germ (1938) und Houska (1939) ist bekannt, daß der osmotische Wert der Zwiebelschuppenepidermen von den äußeren zu den inneren Schuppen ansteigt, daß er von der Basis zur Spitze einer Schuppe zunimmt und sich im Verlauf der Entwicklung ändert.

Wurde in gleicher Weise in einer Thioharnstoffreihe die Grenzplasmolyse erregende Konzentration gesucht, so zeigte sich, daß innerhalb von 15 Minuten erst die Konzentrationsstufen von 0,6 mol aufwärts Plasmaabhebungen verursachten. In 0,4 und 0,5 mol mußte es daher innerhalb dieser Zeit unter dem Einfluß des Thioharnstoffes entweder zu einem Plasmolyseverzug gekommen sein oder es hielten sich der osmotische Wasserentzug und das Eindringen des Thioharnstoffes die Waage.

Der in Tab. 3 wiedergegebene Resistenzversuch wurde Ende März angestellt. Die vom Markt bezogenen Zwiebeln waren vor Verwendung 5 bis 10 Tage bei +5°C gelagert. Im Spätherbst auf ihre Resistenz geprüfte

Zwiebeln zeigten, wie oben angegeben, eine etwas größere Thioharnstoffempfindlichkeit. Ursache hierfür kann eine Sortenverschiedenheit, möglicherweise aber auch ein jahreszeitlich gegebener Resistenzunterschied gewesen sein. Derartige Verschiebungen der chemischen Resistenz in verschiedenen Entwicklungs- und Alterszuständen sind von anderen Objekten her bekannt (Biebl und Rossi-Pillhofer, 1954).

Für die in den Strahlenschutzversuchen gewählte Einwirkungsdauer erwiesen sich diese innerhalb von 48 Stunden auftretenden Resistenzunterschiede jedoch als unerheblich, da es sich zeigte, daß selbst die im Verlauf von 48 Stunden unbedingt letale Konzentration von 0,7 mol bei einer Einwirkungsdauer von nur 30 Minuten und nachträglicher Übertragung in Leitungswasser auch nach mehreren Tagen noch zu keiner tödlichen Schädigung der Zellen führt.

Auch beim Rotkohl erwiesen sich hypertonische Thioharnstofflösungen als sehr schädigend. In einem orientierenden Versuch entsprach der osmotische Wert bei Grenzplasmolyse 0,4 mol Traubenzucker. In 0,5 mol Thioharnstoff waren nach 24 Stunden alle Zellen lebend, in 0,6 mol alle tot.

2. Wirkung sublethaler Thioharnstoffkonzentrationen auf das Protoplasma

Systrophen, d.s. Zusammenballungen des Plasmas um den Zellkern, sind in einem bestimmten Konzentrationsbereich der Thioharnstoffreihe regelmäßig zu beobachten. In einer bestimmten Versuchsreihe waren die Schnitte 48 Stunden nach dem Einlegen in die Lösungen von 0,6 mol Thioharnstoff aufwärts abgestorben. In 0,7 mol Th.H. waren die toten Kerne granuliert, in nicht ganz gleichmäßiger Rundung, mit ihren Nukleolen deutlich zu sehen. In 0,5 mol Th.H. waren sie hingegen durch eine koagulierte, um den Kern zusammengeballte Plasmamasse verdeckt. Von 0,5 mol Th.H. abwärts lebten die Schnitte. In 0,5 mol und 0,4 mol hatten sich deutlich Systrophen ausgebildet. Im Dunkelfeld strahlen die kleinen Kügelchen der Sphärosomen wie unzählige leuchtende Pünktchen in den um den Kern angesammelten Plasmamassen auf. In 0,3, 0,2 und 0,1 mol Th.H. waren hingegen keine Systrophen aufgetreten.

In einer zweiten, gleichartigen Versuchsreihe waren dieselben Erscheinungen zu beobachten, nur um eine Konzentrationsstufe nach abwärts verschoben. Die Todesgrenze lag bei 0,5 mol Thioharnstoff. In 0,6 und 0,7 mol war keine Systrophe eingetreten, in den 0,5 mol Th.H. abgestorbenen Zellen waren noch Reste von Systrophe um die toten Kerne zu erkennen. In 0,4 und 0,3 mol lebten alle Zellen und waren durch starke systrophische Plasmazusammenballungen ausgezeichnet, die in 0,2 und 0,1 mol vollständig fehlten.

U r l (1960), der der Systrophe in Thioharnstofflösungen und in Mischlösungen mit Traubenzucker eine eigene Studie gewidmet hat, fand gleichfalls nach 48 Stunden Liegen der Innenepidermen von *Allium cepa*-Zwiebelschuppen in 0,1, 0,2 und 0,3 mol Th.H. keine und in 0,4 mol schwache systrophische Plasmasammlungen um die Zellkerne. Er schreibt: „Diese Lösung (0,4 mol Thioharnstoff) ist eigentlich knapp hypertonisch, es tritt

aber, wohl infolge von Permeation, keine Plasmolyse ein.“ Hierzu ist zu bemerken, daß wir in unserer oben angeführten Versuchsreihe in 0,4 und 0,5 mol Th.H. sogar nach 48 Stunden noch einige ganz schwache, in ihrer Rückdehnung steckengebliebene Plasmaabhebungen beobachten konnten.

Daß zum Eintritt der Systopie unter Einwirkung von Thioharnstoff ein Plasmolysereiz nötig ist, konnte Url durch Anwendung von Mischlösungen bestens beweisen. Wurde nämlich einer bereits Plasmolyse bewirkenden 0,6 mol Traubenzuckerlösung 0,1, 0,2 oder 0,3 mol Thioharnstoff zugefügt, so trat in allen Fällen schon etwa 4 Stunden nach dem Einlegen

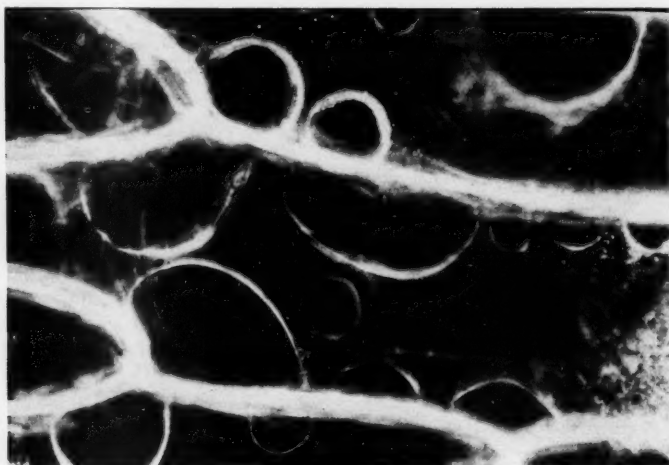


Abb. 2. *Allium cepa*, Innenepidermis. Nach 48 Stunden Aufenthalt in 0,5 mol Thioharnstoff plasmolysiert in 1,5 mol Glyzerin.

der Zwiebel-Innenepidermen in deren Zellen deutliche Plasmasystopie auf. Daß es dabei auf den zugegebenen Thioharnstoff und nicht nur auf den Plasmolysereiz ankam, ergab sich aus Parallelversuchen, in denen Zwiebel-Innenepidermen in 0,6 mol Traubenzucker, 0,6 mol Glyzerin oder 0,6 mol Harnstoff eingebracht wurden. In diesen Fällen kam es trotz Plasmolyse niemals zur Bildung von Systopen.

Auch die Plasmaströmung wird durch den Thioharnstoff beeinflusst: In der oben angeführten ersten Versuchsreihe mit der Todesgrenze in 0,6 mol Th.H. war 48 Stunden nach dem Einlegen in die Lösungen in 0,1, 0,2 und 0,3 mol Th.H. noch gute Plasmaströmung zu beobachten. In 0,4 mol waren die verschiedenen Plasmaorganellen (Chondriosomen, Sphärosomen) noch in schwach zitternder Brownscher Molekularbewegung und in 0,5 mol war das Plasma bereits völlig erstarrt. In der zweiten Reihe mit der Todesgrenze in 0,5 mol Th.H. war nach 48 Stunden Einwirkung ebenfalls in 0,1 und 0,2 mol noch verhältnismäßig gute Plasmaströmung erhalten, in 0,3 und 0,4 mol hingegen nur mehr BMB.

Die Plasmolyseform (Weber 1924, 1925) der 48 Stunden mit Thioharnstoff vorbehandelten Schnitte läßt in den höchsten noch nicht letalen Konzentrationen eine Verfestigung des Protoplasmas erkennen, auf die auch schon Höfler (1939) und Url (1960) hingewiesen haben. Abb. 2 zeigt Zwiebel-Innenepidermiszellen aus 0,5 mol Thioharnstoff (48 Stunden Einwirkung) plasmolysiert in 1,5 mol Glycerin. Die Protoplaste sind tief buchtig abgehoben und zeigen häufig kleine runde Dellen. Löcher oder Fenster, ähnlich wie sie neben Dellen bei Plasmolyse von Jost (1929) an *Valonia*-, von Höfler (1932) an *Cladophora*- oder von Küster (1933) an

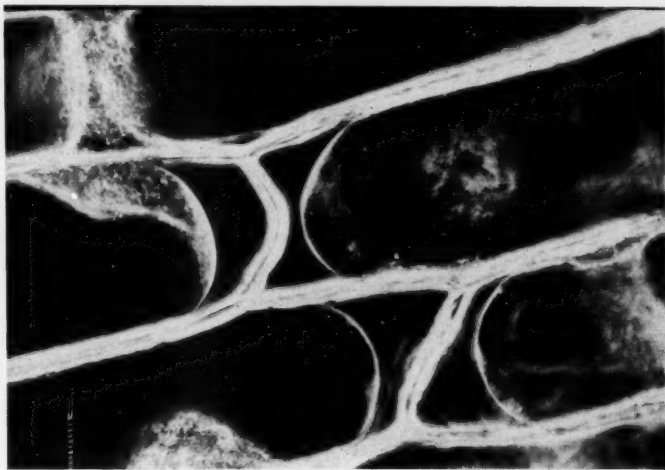


Abb. 3. *Allium cepa*, Innenepidermis. Nach 48 Stunden Aufenthalt in 0,4 mol Thioharnstoff plasmolysiert in 1,5 mol Glycerin.

Codium-Protoplasten erstmals beschrieben und auch an stark UV-bestrahlten Außenepidermen von *Allium*-Zwiebelschuppen nach Plasmolyse in CaCl_2 oder KCl (Biebl 1942 a) beobachtet wurden, waren hingegen nicht zu sehen.

Diesen zähen, tiefkonkaven, fast krampfartigen Plasmaabhebungen stehen nach gleich langer Vorbehandlung mit 0,4 mol Thioharnstoff und weniger in 1,5 mol Glycerin saubere bikonvexe Plasmolysen gegenüber. Auf Abb. 3 ist zu sehen, daß es dabei auch gelegentlich zu „Kappenbildungen“ kommen kann. Die Dunkelfeldaufnahme läßt weiters an dem Aufleuchten der zahlreichen Sphärosomen die systrophische Zusammenballung des Plasmas um die Zellkerne erkennen. In der Zelle links oben liegt der Systropheklumpen in der Zellmitte zwischen dem zweigeteilten Tonoplasten.

Die Chondriosomen erweisen sich, was ihre Form anlangt, ebenso wie gegen verschiedene andere schädliche Einwirkungen, auch gegen Thioharnstoff als sehr empfindlich. Während sie nach 48 Stunden Aufenthalt der Innenepidermisschnitte in Leitungswasser im allgemeinen in Form kürzerer

oder längerer, sich im strömenden Plasma schlängelnd dahin bewegender Stäbchen ausgebildet sind, sind sie nach der gleichen Zeit schon in 0,05 mol Thioharnstoff durchwegs kurz oder überhaupt abgerundet. Gleiches gilt für die im Wasser häufig amöboid, zipfeligen winzigen Leukoplasten. Auch diese runden sich nach längerem Aufenthalt in Thioharnstofflösungen ab.

3. Die Permeabilität des Thioharnstoffes

Die Permeabilität des Thioharnstoffes, seine Fähigkeit in die Zelle einzudringen, ist für seine Wirkung als Strahlenschutzstoff von ganz besonderem Interesse, denn, wie schon einleitend erwähnt, nur der bis zum Zeitpunkt der Bestrahlung in die Zelle bzw. in das Protoplasma eingedrungene Stoff kann eine Schutzwirkung ausüben.

„Die Permeierfähigkeit der Harnstoffderivate spielt seit Overton (1899) in der Permeabilitätstheorie eine bedeutsame Rolle. Methylharnstoff und Sulfoharnstoff dringen wesentlich rascher durch das Plasma als der Harnstoff, obwohl ihr Molekularvolumen größer ist; dies ist eine Tatsache, die erkennen läßt, daß die Molgröße nicht in erster Linie für die Permeierfähigkeit einer Verbindung bestimmend sein kann. Die Lipoidlöslichkeit der genannten Verbindungen ist dagegen größer als die der Stammsubstanz Harnstoff, was mit der Forderung der Löslichkeitstheorie in Einklang steht“ (Höfler 1934).

Exakte Permeabilitätsbestimmungen in gleichmäßig, annähernd rechteckig geformten Zellen ermöglicht die plasmometrische Methode Höflers (1918, ausführliche Beschreibung der Methode später bei Höfler 1934 b, Hofmeister 1935, Strugger 1935 u. a.).

Als Maß der Permeabilität wird üblicherweise verwendet ΔG und P' .

ΔG ist die Änderung des Plasmolysegrades pro Stunde ($G_2 - G_1$). Als Plasmolysegrad G wird das Verhältnis des Volumens des Protoplasten zu dem der Zelle bezeichnet ($G = \frac{V_P}{V_Z}$). Dieses errechnet sich nach der Formel

$$G = \frac{l - \frac{b}{3}}{h} \quad \text{wobei } l \text{ die Länge des bikonvex abgehobenen Protoplasten, } h \text{ die}$$

Länge der Zelle und b die Breite der Zelle bzw. des Protoplasten ist. Wurde eine Zelle in einer hypertonen Lösung von der Konzentration C plasmolysiert, so ergibt sich ihr osmotischer Wert aus der Gleichung $O = \frac{V_P}{V_Z} \cdot C$

oder $O = G \cdot C$. Handelt es sich um eine permeierende Substanz, so dehnt sich der Protoplast in dem Maß, in dem diese ins Zellinnere (Vakuole) eindringt, wieder aus. Die osmotische Wertzunahme $O_2 - O_1 = C (G_2 - G_1)$ läßt die Menge des eingedrungenen Plasmolytikums erschließen. Für ein bestimmtes Zeitintervall (Beobachtungszeiten t_1 und t_2) ist die Stoffaufnahme

$$M = C \cdot \frac{G_2 - G_1}{t_2 - t_1} \quad \text{oder auf die Stunde berechnet } M = C \cdot \Delta G.$$

P' ist die „Permeationskonstante des Protoplasten“ für den betreffenden

Stoff (die auf die Flächeneinheit des Protoplasten reduzierte „Permeationskonstante des Protoplasmas“ wird mit Collander als P bezeichnet).

$P' = \frac{C-c}{M}$ wobei c die jeweilige Konzentration des bereits in den Zellsaft eingedrungenen Diosmotiums in mol darstellt, die nach Höfler (1934) durch lineare Extrapolation aus der Stoffaufnahme des zu wertenden Intervalles berechnet wird. Ashida (s. Hofmeister 1938, 1949, Kreuz 1941) weist darauf hin, daß sich das c in obiger Formel auf den Innenraum der entspannten Zelle und nicht auf den jeweilig von dem sich ausdehnenden Protoplasten eingenommenen Raum bezieht und daher genauer noch durch den mittleren Plasmolysegrad $g \left(= \frac{G_1 + G_2}{2} \right)$ des gewerteten Intervalles dividiert werden muß. Mit dieser „Ashida-Korrektur“ lautet die Formel

$$\text{daher } P' = \frac{\frac{M}{g} (C - c)}{g}.$$

Thioharnstoff erweist sich, wie schon aus den Resistenzversuchen hervorgegangen ist, in hypertonischen Lösungen meist als recht schädlich. Permeabilitätsbestimmungen nach obiger Methode sind daher nur an besonders resistentem Material möglich.

Handelt es sich nun um die Bestimmung der Permeabilität von Stoffen, die in höheren Konzentrationen schädlich wirken, so bedient man sich mit Vorteil der sogenannten Partialmethode (Hofmeister 1935). Hierzu werden die Schnitte zuerst in einer Traubenzuckerlösung von der Konzentration C plasmolysiert. Der erreichte Plasmolysegrad sei G . Hierauf werden die Schnitte in eine kombinierte Lösung von der gleichen Traubenzuckerkonzentration plus einer noch unschädlichen Konzentration (D) des zu untersuchenden Diosmotikums übertragen. Unter der Einwirkung der jetzt höheren Gesamtkonzentration wird der Vakuole neuerlich Wasser entzogen und der Protoplast zieht sich weiter zusammen. Weil aber das Zusatzplasmolytikum im Gegensatz zum Traubenzucker allmählich durch das Plasma in die Vakuole eindringt, dehnt sich der Protoplast — entsprechend der Geschwindigkeit der Permeation des betreffenden Stoffes — wieder bis auf den durch die Zuckerlösung bedingten Plasmolysegrad aus. Aus der plasmometrisch gemessenen Rückdehnungskurve läßt sich wiederum die Permeationskonstante P' berechnen. Für die durch die Partialmethode

gewonnenen Konstante P'_p gilt die Beziehung $P'_p = \frac{M}{D-c'}$, wobei zur Berechnung von M die Gesamtkonzentration $C + D$ herangezogen werden muß und c' die bis zur Messung in die Zelle eingedrungene Menge des Zusatzplasmolytikums bedeutet.

Für einen relativen Vergleich der Permeationsgeschwindigkeit verschiedener Diosmotica genügt oft auch schon die Bestimmung der *Depiasmolysezeit*, d.h. der Zeit vom Einlegen des Schnittes in das hypertonische Diosmoticum bis zur vollständigen Wiederausdehnung des anfangs durch Wasserentzug abgehobenen, plasmolysierten Protoplasten.

Nach Hofmeister (1949) läßt sich aber auch aus einem Deplasmolysezeit-Versuch mit guter Annäherung P' berechnen, und zwar nach folgender Formel:

$$P'_d = \frac{M \cdot \frac{(C-O) \cdot 60}{T}}{C - \left(\frac{C-O}{2}\right)} = \frac{120 (C-O)}{T \cdot (C+O)}$$

P'_d = Permeationskonstante in einem Deplasmolysezeit-Versuch gemessen, C = Konzentration des auf seine Permeation zu bestimmenden Plasmolytikums, O = der osmotische Wert des Objektes (bestimmt mit einer nicht permeierenden Rohr- oder Traubenzuckerlösung nach $O = C \cdot G$, T = Deplasmolysezeit.

Diese Methode läßt sich auch im Partialverfahren anwenden:

$$P'_{dp} = \frac{M}{C-c} = \frac{D \cdot 60}{T \cdot \frac{D}{2}} = \frac{120}{T}$$

P'_{dp} = Permeationskonstante im Partialverfahren in einem Deplasmolysezeit-Versuch gemessen, D = Konzentration des permeierenden Zusatzdiosmotikums, T = Deplasmolysezeit.

Url (1951, 1952) verwendete den Hofmeisterschen Ansatz $M = \frac{(C-O)}{T} \cdot 60$

aus der erstangeführten Gleichung auch zur orientierenden Bestimmung des ΔG im Deplasmolysezeit-Versuch, und zwar nach der Formel:

$$\Delta G = \frac{(C-O) \cdot 60}{T \cdot C}$$

Die in der Literatur mitgeteilten Permeationskonstanten P' für den Thioharnstoff zeigen recht verschiedene Werte und schwanken zwischen 0,10 und 8,40. Um die allgemeinen Permeabilitätsverhältnisse der betreffenden Plasmen näher zu charakterisieren, sind in Tab. 4 zum Vergleich auch die P' -Werte für Harnstoff, Methylharnstoff und Glycerin angeführt. Auch die von uns bestimmten P' -Werte für *Allium cepa* (Innenepidermis) und Rotkohl (Epidermis der Blattunterseite) sind in diese Zusammenstellung aufgenommen.

Zur Bestimmung der Thioharnstoffpermeabilität der Zwiebel-Innenepidermen mußte wegen der großen Schädlichkeit hypertonischer Thioharnstoffkonzentrationen die Partialmethode angewendet werden. Den Verlauf eines solchen, an vier Zellen plasmometrisch gemessenen Partialversuches (0,5 mol Traubenzucker + 0,4 mol Thioharnstoff) zeigt Abb. 4.

Nach Übertragung aus 0,5 mol Traubenzucker in die Mischlösung ziehen sich die Protoplaste zuerst rasch zusammen, um sich dann gemäß dem Eintritt des Thioharnstoffes langsam wieder auszudehnen. Es wurden aus den Kurven die ΔG -Werte gerechnet. Eine Berechnung von P' konnte unterbleiben, da sich bei so langsamer Permeation die Werte für ΔG und P' kaum unterscheiden. Die ΔG -Werte waren für Zelle 1: 0,126, für Zelle 2: 0,096, für Zelle 3: 0,132 und für Zelle 4: 0,090.

Auch im Deplasmolysezeit-Partialversuch ($P'_{dp} = \frac{120}{T}$) ergab sich für

Thioharnstoff ein den obigen Messungen entsprechender Wert für P' um 0,1. Die Rückdehnungszeiten bewegten sich um 20 und 24 Stunden.

Die Permeationskonstanten für Harnstoff und Glycerin wurden nach der normalen Deplasmolysezeitmethode von Hofmeister $\left(P'_d = \frac{120(C-O)}{T(C+O)}\right)$

bestimmt. Der osmotische Wert O entsprach 0,45 mol Traubenzucker. Die Konzentration C des Plasmolytikums betrug in beiden Fällen 0,8 mol. In

Tabelle 4. Zusammenstellung einiger bekannter Permeationswerte für Thioharnstoff und einige andere Diosmotica (geordnet nach steigender Thioharnstoff-Permeation).

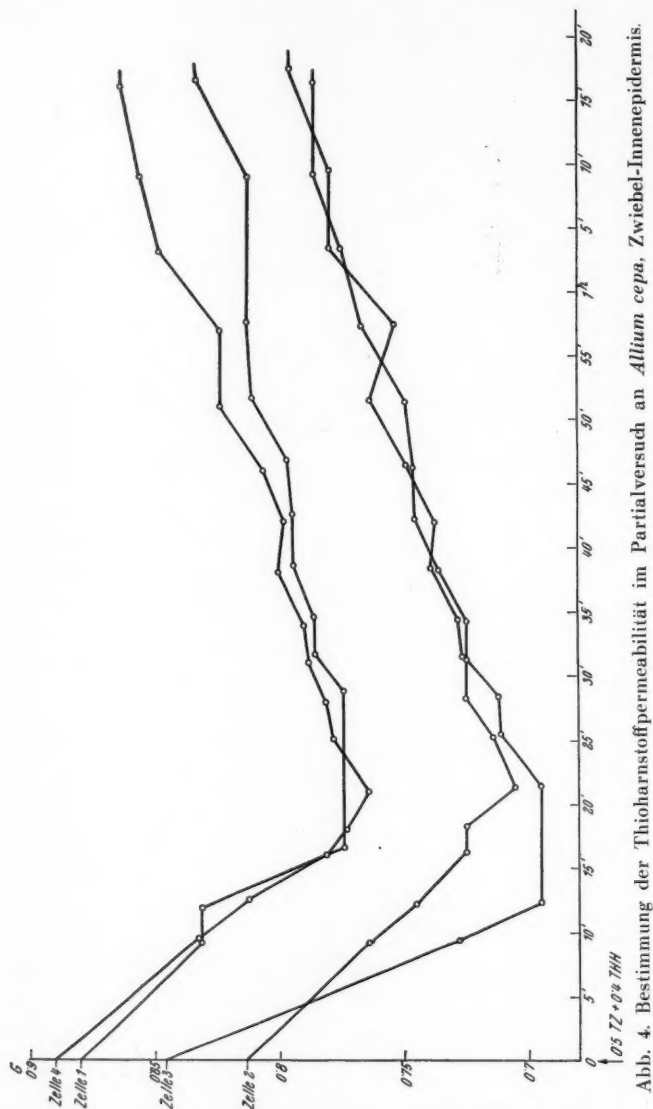
Objekt	Thioharnstoff	Harnstoff	Methylharnstoff	Glycerin	Maß der Perm.	Autor
<i>Caltha palustris</i>	0,105	0,07	0,203	0,116	P'	Hofmeister 1935
<i>Allium cepa</i> , I. E.	0,12—0,14	0,12	—	0,066	P'_d	
<i>Rhoeo discolor</i>	0,103	0,059	0,185	0,260	P'	Bärlund 1929
<i>Anemone hepatica</i>	0,21	0,078	0,5	0,016	P'	Hofmeister 1935
<i>Chara ceratophylla</i>	0,25	0,13	0,22	0,024	P'	Collander u. Bärlund 1933
<i>Nitella mucronata</i>	3,6	1,3	3,2	0,032	$P \cdot 10^7$	Collander 1954
<i>Tradescantia elongata</i>	0,37	0,038	0,15	0,042	P'	Hofmeister 1935
<i>Majanthemum bifolium</i>	0,624	0,183	0,527	0,066	P'	Höfler 1934
<i>Zygema</i> sp.	0,646	0,19	0,73	0,258	P'	Hofmeister 1935
<i>Muscari racemosum</i>	0,834	0,377	1,825	0,69	P'	Hofmeister 1935
Rotkohl	1,0	0,66	—	2,0	P'_d	
<i>Iris pseudacorus</i>	1,44	0,18	1,8	0,077	P'	Hofmeister 1935
<i>Ranunculus repens</i>	1,83	0,144	0,89	0,750	P'	Hofmeister 1935
<i>Elodea densa</i>	2,0	0,67	1,7	0,14	P'	Marklund 1936
Fucus-Eier	4,25	0,57	3,44	0,25	P'	Resüür 1935
<i>Taraxacum officinale</i>	6,54	3,88	4,92	0,474	P'	Hofmeister 1935
<i>Lemna minor</i>	3,4	2,6	1,3	0,19	P'	Marklund 1936

Harnstoff betrug die Deplasmolysezeit 4,5 Stunden, d. s. 270 Minuten, in Glycerin 8,5 Stunden, d. s. 510 Minuten. Daraus errechnet sich P'_d für Harnstoff mit 0,12 und für Glycerin mit 0,066.

Es fällt gegenüber allen in der Tab. 4 zusammengestellten bekannten Permeabilitätswerten für Thioharnstoff und Harnstoff auf, daß bei *Allium cepa*, Innenepidermis, diese beiden Werte annähernd gleich hoch liegen. In allen übrigen Fällen erfolgt die Permeation des Thioharnstoffes wesentlich schneller als die des Harnstoffes.

Die Zellen der Epidermen der Blattunterseite des Rotkohls folgen hingegen wieder der Norm. Thioharnstoff permeiert deutlich schneller als Harnstoff. Die unregelmäßigen Formen der Rotkohlepidermis machen die Anwendung der plasmometrischen Methode fast unmöglich. Es wurden daher wieder die Hofmeistersche Deplasmolysezeitmethode herangezogen.

Zur Bestimmung der Thioharnstoffpermeabilität wurde sie in der Abwandlung der Partialmethode angewendet. Es wurde eine Mischlösung von



0,46 mol Traubenzucker + 1,0 mol Thioharnstoff benutzt. Die Deplasmolysezeit betrug um 120 Minuten. P'_{dp} ist demnach rund 1,0.

Die Permeabilität von Harnstoff und Glycerin wurde mit der normalen Deplasmolysezeit-Methode bestimmt. Der osmotische Wert der Zellen liegt um 0,5 mol Traubenzucker. In 1,0-molarer Harnstofflösung betrugen die Deplasmolysezeiten um 30 Minuten, P'_d war daher etwa 0,6. In 1,5 mol Glycerinlösung betrugen die Deplasmolysezeiten ebenfalls um 30 Minuten, P'_d war daher etwa 2,0. Die Rotkohlzellen zeigen also einen starken Glycerintyp (d. h. Glycerin permeiert schneller als Harnstoff). In einem Fall konnte in einer etwas günstiger geformten Zelle die Rückdehnung des Protoplasten auch exakt plasmometrisch verfolgt werden. Bei zwei gemessenen Intervallen ergab sich für das erste ein ΔG von 2,3, für das zweite ein solches von 1,6.

Aus den P' -Werten für den Thioharnstoff läßt sich errechnen, wie viel von diesem Diosmoticum ungefähr in der Stunde in den Zellsaftraum eindringt. Wie im vorigen ausgeführt, gilt $P' = \frac{M}{C-c}$. Da in der annäherungsweisen Berechnung mit der Deplasmolysezeitmethode c vernachlässigt werden kann, ist es erlaubt $P' = \frac{M}{C}$ zu setzen. Daher ist die eingedrungene Menge $M = P' \cdot C$. Danach würde nach unseren Werten in die Zwiebelinnenepidermiszelle ungefähr 0,05 mol, in die Rotkohlzelle hingegen 1,0 mol Thioharnstoff pro Stunde eindringen.

Tabelle 5. *Verhältnis der Permeation des Thioharnstoffes (= 1) zu der einiger anderer Diosmotica.*

(Zusammenstellung aus der Literatur, Autoren wie Tab. 4.)

Nr.	Objekt	Thioharnstoff	Harnstoff	Methylharnstoff	Glycerin	Harnstoff/Glycerin
1	Nitella mucronata	1	0,36	0,89	0,009	40 : 1
2	Taraxacum officinale	1	0,59	0,75	0,025	23 : 1
3	Lemna minor	1	0,31	0,15	0,022	14 : 1
4	Chara ceratophylla	1	0,52	0,88	0,096	5,4 : 1
5	Anemone hepatica	1	0,37	2,4	0,076	4,8 : 1
6	Elodea densa	1	0,33	0,85	0,07	4,7 : 1
7	Majanthemum bifolium	1	0,29	0,84	0,1	2,9 : 1
8	Fucus-Eier	1	0,13	0,81	0,059	2,2 : 1
9	Iris pseudacorus	1	0,1	1,2	0,053	1,9 : 1
9a	Allium cepa, I. E.	1	0,98— 1,0	—	0,47	1,9 : 1
10	Tradescantia elongata	1	0,1	0,4	0,11	1 : 1
11	Zygnema sp.	1	0,29	1,1	0,4	0,72 : 1
12	Caltha palustris	1	0,66	1,9	1,1	0,6 : 1
13	Muscari racemosum	1	0,45	2,2	0,83	0,54 : 1
13a	Rotkohl (Brassica oleracea)	1	0,66	—	2,0	0,3 : 1
14	Rhoeo discolor	1	0,56	1,8	2,5	0,2 : 1
15	Ranunculus repens	1	0,078	0,48	0,4	0,19 : 1

Um einen Vergleich dieser beiden Permeationswerte mit den Werten aus der Literatur zu ermöglichen, wurden in Tab. 5 alle Thioharnstoffwerte gleich 1 gesetzt und die Werte für Harnstoff, Glycerin und Methylharnstoff dazu ins entsprechende Verhältnis gebracht. Die Objekte sind angeordnet nach fallendem Harnstoff/Glycerin-Verhältnis.

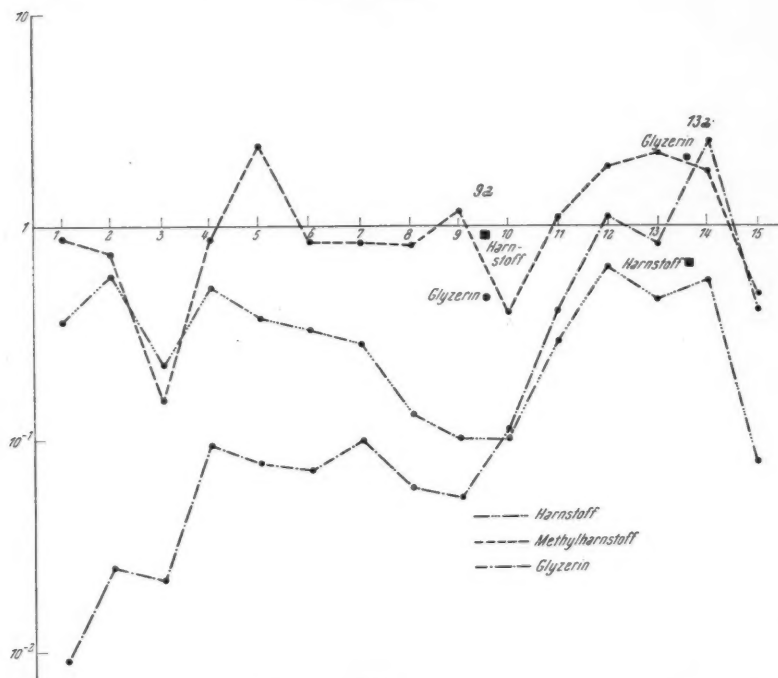


Abb. 5. Graphische Darstellung des Verhältnisses der Permeation einiger Diosmotica (Harnstoff, Methylharnstoff, Glycerin) zu der des Thioharnstoffes (= 1 gesetzt.) Die Ziffern 1—15 auf der Abszisse geben die Nummer der verschiedenen Versuchspflanzen an (siehe Tab. 5).

In Abb. 5 sind diese Permeationsverhältnisse graphisch dargestellt, und zwar derart, daß die Pflanzen nach fallendem Verhältnis Harnstoff/Glycerin von links nach rechts angeordnet sind. Links stehen also die Pflanzen, bei denen der Harnstoff wesentlich schneller als Glycerin permeiert („Harnstofftyp“), rechts jene, deren Plasma für Glycerin schneller durchlässig ist als für Harnstoff („Glycerintyp“).

Es zeigt sich ein deutliches Parallellaufen der Linien für Harnstoff, Glycerin und Methylharnstoff. Die durch ihre Höhe herausfallenden Methylharnstoffwerte von *Anemone* (Nr. 5) und *Iris* (Nr. 9) dürften zu hoch gemessen sein. Es handelt sich nämlich dabei um Fälle, in denen der Methylharnstoffwert über sechsmal höher ist als der Harnstoffwert. Collander und

Wikström (1949) haben aber dargetan, daß in solchen Fällen mit einer sekundären, pathologischen Erhöhung der Permeabilität des Methylharnstoffes zu rechnen ist.

Tragen wir unsere beiden Objekte, *Allium cepa* und Rotkohl, entsprechend dem Verhältnis ihrer Harnstoff- und Glycerinpermeabilität ein, so kommt *Allium cepa* zwischen die Pflanzen Nr. 9 und 10 (*Iris* und *Tradescantia*) und Rotkohl zwischen Nr. 13 und 14 (*Muscari* und *Rhoeo*) zu stehen. Während sich nun die Werte für Rotkohl gut in die Kurven einfügen, liegen die Punkte für *Allium cepa* um fast eine Größenordnung zu hoch. Es findet sich in der Literatur kein Fall, in dem der Harnstoff auch nur annähernd so schnell permeiert wie der Thioharnstoff. Das läßt vermuten, daß die in den Partialversuchen gemessene Thioharnstoffpermeabilität nur durch besondere Umstände so niedrig gehalten ist. Vermutlich hängt dies mit der schon im Kapitel über die Thioharnstoffresistenz erwähnten Verfestigung des Tonoplasten unter der Einwirkung des Thioharnstoffes zusammen, die anscheinend mit einer Herabsetzung der Durchlässigkeit für Thioharnstoff verbunden ist. Ob die Intrabilität, d. h. das Eindringen des Thioharnstoffes bis in das Protoplasma auch schon verzögert ist, läßt sich durch diese Versuche nicht entscheiden.

III. Schutzwirkung des Thioharnstoffes gegen UV-Bestrahlung

1. Grundbeobachtungen

Schon die ersten orientierenden Versuche an Innenepidermen der Zwiebel-schuppe, an Epidermiszellen der Blattunterseite (Mittelrippe) von *Rhoeo discolor* und solchen der Blattunterseite vom Rotkohl (*Brassica oleracea*) ergaben nach Thioharnstoff-Vorbehandlung eine deutliche Schutzwirkung gegen kurzwellige UV-Strahlen und ließen die Pflanzenzellen als sehr geeignete Objekte für die Prüfung chemischer Schutzstoffe erkennen, worüber bereits an anderer Stelle kurz referiert wurde (Biebl 1960).

Tabelle 6. *Rhoeo discolor*, Blattunterseite, Mittelrippe. Schutzwirkung des Thioharnstoffes, 24h nach der Bestrahlung.

Art der Vorbehandlung	Dauer der Bestrahlung (min)						
	¾	1	1½	2	3	4	5
Kontrolle, H ₂ O	1	1	1	±	+	+	+
19h, 0,1 Thioharnstoff	1	1	1	1	1	±	+

Entsprechend den ursprünglich angewandten langen Vorbehandlungszeiten von 4 bis 24 Stunden wurde 0,1 mol Thioharnstoff gewählt, welche Konzentration sich in den vorangegangenen Resistenzversuchen (vgl. II, 1) während dieser Zeit als unschädlich erwiesen hat. Die Bestrahlung wurde auf mit Thioharnstoff getränktem Filterpapier vorgenommen. Nach der Bestrahlung wurden die Schnitte sofort in Fläschchen mit Leitungswasser übertragen und im allgemeinen 24 Stunden später untersucht.

Bei *Rhoeo discolor* (Tab. 6) ließ sich durch 19 Stunden Thioharnstoff-Vorbehandlung die Todesgrenze von 2 Minuten auf 4 Minuten Bestrahlung hinaufsetzen.

Beim Rotkraut zeigten sich gleichfalls in jedem Versuch deutliche Schutzwirkungen des Thioharnstoffes, doch lagen bei verschiedenem Versuchsmaterial die Todesgrenzen sowohl bei den nichtvorbehandelten wie bei den mit Th.H. vorbehandelten Schnitten recht verschieden hoch (Tab. 7). Der Grund hierfür dürfte, entsprechend den Erfahrungen an Zwiebel-schuppenaußenepidermen (vgl. Abschnitt I), zu einem wesentlichen Teil in verschiedenen Zellwanddicken der verwendeten Epidermen gelegen sein. Aus den verschiedenen langen Vorbehandlungszeiten in diesen zu verschiedenen Zeiten durchgeführten Versuche können daher keinerlei Schlüsse gezogen werden.

Tabelle 7. Rotkohl. Schutzwirkung des Thioharnstoffes. 24^h nach der Bestrahlung.

Vers. Datum	Art der Vorbehandlung	Dauer der Bestrahlung (min)											
		1	1½	1¾	2	2½	3	3½	4	5	6	7	8
21. 10. 1959	Kontrolle, H ₂ O 24h, 0,1 Th.H.	1	1	±	+	+	+	+	+				
		1	1	1	1	1	-1	±	±				
28. 10. 1959	Kontrolle, H ₂ O 6h, 0,1 Th.H.	1	1	1	1	+	+	+	+				
		1	1	1	1	1	1	1	(±)				
2. 3. 1960	Kontrolle, H ₂ O 4h, 0,1 Th.H.	1	1	1	1	1	1	±	+	+	+	+	+
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	±	+

Die Ungleichmäßigkeit dieses Materials war auch der Grund, weshalb für die meisten großen Versuchsserien, zu denen manchmal bis zu 90 gleichartiger Schnitte benötigt wurden, Innenepidermen der Zwiebelschuppe von *Allium cepa* verwendet wurden, die ein viel einheitlicheres Verhalten aufweisen.

Um die Sonderstellung des Thioharnstoffes gegenüber anderen osmotisch wirksamen Stoffen zu sichern, wurde an einer streng vergleichbaren Versuchsserie mit Innenepidermen der zweiten und dritten fleischigen Schuppe einer und derselben Zwiebel außer mit 0,1 mol Thioharnstoff auch mit Harnstoff, Traubenzucker, Glycerin, KCl und CaCl₂ vorbehandelt, und zwar jeweils 30 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte auf mit den entsprechenden Lösungen getränktem Filterpapier bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Schnitte in Leitungswasser gehalten (Tab. 8). Als „unbestrahlte Kontrollen“ dienten, wie bei allen Bestrahlungsversuchen, die mit dem Schott WG₅-Filter (durchlässig für Strahlen länger als 310 mμ) abgedeckten Hälften jedes Schnittes. Es ergab sich kein Fall, in dem diese während der Dauer des Versuches eine Schädigung aufgewiesen hätten, so daß ihr Lebenszustand („l“) in den Tabellen gar nicht angeführt wird.

In allen folgenden, die Zwiebelinnenepidermis betreffenden Tabellen ist auch der Grad der Plasmaströmung vermerkt, doch soll auf diese erst in

einem späteren Abschnitt eingegangen werden. Es wird dann dort auf die Tabellen rückverwiesen werden.

Das Ausmaß der Thioharnstoffschutzwirkung in den Innenepidermen der Zwiebeluschuppe ist bei gleicher Th.H.-Konzentration (0,1 mol) nicht immer gleich groß. Die Versuche wurden nicht durchwegs mit der gleichen Sorte ausgeführt und zudem wurden die Zwiebeln zu verschiedenen Zeiten gekauft. Möglicherweise werden durch die Umstände der Lagerung (besonders Temperaturunterschiede während der Wintermonate) Unterschiede bedingt, die die Wirksamkeit des Strahlenschutzes beeinflussen. Wir

Tabelle 8. *Allium cepa*. Innenepidermis. Schutz des Thioharnstoffes im Vergleich zu anderen Substanzen (24^h nach der Bestrahlung).

Vorbehandlung (30 Minuten)	Dauer der Bestrahlung (min)						
	1/2	3/4	1	1 1/2	2	2 1/2	3
Kontrolle, H ₂ O	1(-)	1-	(±)	+	+	+	+
0,1 mol Thioharnstoff	1-	1(-)	1(-)	1-	1-	1-	±
0,2 mol Harnstoff	1(-)	1-	±	+	+	+	+
0,2 mol Traubenzucker	1(-)	1-	(±)	+	+	+	+
0,2 mol Glycerin	1(-)	1-	(±)	+	+	+	+
0,06 mol KCl	1(-)	1-	(±)	+	+	+	+
0,04 mol CaCl ₂	1(-)	1-	(±)	+	+	+	+

Zeichen: 1 · lebend, beste Plasmaströmung

1(-) gute bis schwache Plasmaströmung

1- schwächste Plasmaströmung bis BMB

— fast alles lebend, vereinzelte tote Zellen

(±) 10—20% tot

± mehr als 20% tot

+ alles tot, bzw. nur mehr vereinzelte Zellen lebend.

erhielten aus unseren Versuchen den Eindruck, daß eine größere Gleichmäßigkeit der Schutzwirkung zu erreichen war, wenn die vom Markt geholten Zwiebeln vor ihrer Verwendung 5—10 Tage in einem Kühlschrank bei +5° C gehalten wurden.

2. Abhängigkeit der Schutzwirkung des Thioharnstoffes von der Dauer der Vorbehandlung

Wie schon erwähnt (Abschnitt II, 3) haben die Permeabilitätsversuche ein langsames Eindringen des Thioharnstoffes in die Vakuolen der Zwiebel-Innenepidermiszellen ergeben. Dies ließ die Notwendigkeit einer verhältnismäßig langen Vorbehandlung mit Thioharnstoff erwarten.

Da in einigen Versuchen eine mehrstündige Vorbehandlung (4, 6 und 12 Stunden) mit 0,1 mol Thioharnstoff keine wesentlich anderen Ergebnisse zeitigten wie eine 30-Minuten-Vorbehandlung, wurde an streng vergleichbaren Epidermen einer und derselben Zwiebel noch kürzere Einwirkungszeiten geprüft. Dabei zeigte sich, daß auch eine Verkürzung der Vorbehand-

lungszeit auf 15, 10 und 5 Minuten nur eine geringfügige Verminderung der Schutzwirkung mit sich brachte (Tab. 9).

Da sogar eine nur 5 Minuten lange Vorbehandlung mit 0,1 mol Thioharnstoff noch eine sehr deutliche Schutzwirkung hatte, wurde schließlich der Versuch gemacht, die Epidermisschnitte, aus Wasser kommend, nur auf mit 0,1 mol Thioharnstoff getränktem Filterpapier zu bestrahlen. Anschließend daran kamen die Schnitte, wie immer, sofort wieder in Leitungswasser. Überraschenderweise war auch diese kurze Einwirkungszeit ausreichend, um eine Schutzwirkung auszuüben. Es sei in diesem Zusammenhang noch einmal betont, daß die Epidermen dabei nur durch ihre Unterseiten von dem

Tabelle 9. *Allium cepa*, Innenepidermis, Schutzwirkung von 0,1 mol Thioharnstoff nach verschieden langer Vorbehandlung (24h nach der Bestrahlung).

Vorbehandlung	Bestrahlungsdauer (min)						
	1/2	3/4	1	1 1/2	2	2 1/2	3
Kontrolle, H ₂ O.	1(-)	1·	-1·	+	+	+	+
0,1 Th.H., 30 Min.	1·	·	1(-)	1(-)	1(-)	1·	-1·
0,1 Th.H., 15 Min.	1·	1·	1(-)	1·	1·	-1·	±
0,1 Th.H., 10 Min.	1·	1·	1(-)	1·	1·	-1·	+
0,1 Th.H., 5 Min.	1·	1·	1(-)	1·	1·	-1·	±

Filterpapier den Thioharnstoff aufnehmen konnten. Die Oberseite wurde, wie immer, mit einem trockenen Filterpapier abgesaugt, so daß eine Absorption der UV-Strahlen durch eine über den Schnitten stehende Thioharnstoffschichte auf keinen Fall in Frage kam.

Tab. 10 gibt einige Versuche wieder, in denen vergleichsweise die letale Bestrahlungsdauer bestimmt wurde von Kontrollen in Wasser, von Epidermen, die 30 Minuten mit 0,1 mol Thioharnstoff vorbehandelt auf thioharnstoffgetränktem Filterpapier und solchen, die ohne Vorbehandlung nur auf Thioharnstoff bestrahlt wurden.

Die Tab. 10 zeigt, daß trotz verschiedener absoluter Strahlenresistenz der verwendeten Epidermen und verschiedener Schützbarkeit in allen Fällen auch die nur auf Thioharnstoff bestrahlten Schnitte einen deutlichen Schutz erkennen lassen. Rechnet man für das Auflegen der Schnitte und die Vorbereitung zur Bestrahlung 1 1/2 Minuten (eine Zeit, die bei allen übrigen Vorbehandlungszeiten auch noch dazukommt), so waren die Epidermen maximal 5 1/2 Minuten von der Unterseite her der Einwirkung des Thioharnstoffes ausgesetzt. Zieht man aber nur die Zeit bis zur tatsächlichen Bestrahlung der einzelnen Schnitte in Betracht, so ist diese für die niedrigeren Bestrahlungszeiten noch entsprechend kürzer.

Der Thioharnstoff muß also geradezu rapid in das Protoplasma eindringen — oder, sofern seine Schutzwirkung wesentlich auf Absorption beruht, die Zellwand imbibieren.

Für diese Annahme spricht weiters auch die Schnelligkeit, mit der die Wirkung einer längeren Vorbehandlung mit Thioharnstoff durch eine kurze,

5 Minuten lange Wässerung vor der Bestrahlung fast oder ganz wieder aufgehoben werden kann. Das würde heißen, daß der im Plasma befindliche

Tabelle 10. *Allium cepa*, *Innenepidermis*. Schutzwirkung einer Bestrahlung nur auf 0,1 mol Thioharnstoff ohne Vorbehandlung.

Vorbehandlung	Dauer der Bestrahlung (min)								
	1/4	1/2	3/4	1	1 1/2	2	2 1/2	3	4
Kontrolle, H ₂ O	1·	1·	(±)	+	+	+	+	+	
0,1 Th.H., 30 Min.	1·	1·	1·	1·	(±)	±	±	+	
nur bestrahlt	1·	1·	1·	+	+	+	+		
auf 0,1 Th.H.									
Kontrolle, HO ₂	1·(-)	(±)	+	+	+	+	+	+	
0,1 Th.H., 30 Min.	1·	1·	1·(-)	1·	(±)	±	±	+	
nur bestrahlt	1·	1·(-)	±	+	+	+	+	+	
auf 0,1 Th.H.									
Kontrolle, H ₂ O	1·	1·	1·	+	+	+	+	+	+
0,1 Th.H., 30 Min.	1·	1·	1·(-)	1·(-)	1·(-)	1·(-)	1·(-)	1·(-)	(±)
nur bestrahlt	1·(-)	1·(-)	1·(-)	1·	1·	1·	±	+	+
auf 0,1 Th.H.									
Kontrolle, H ₂ O	1·(-)	1·(-)	1·	±	+	+	+		
nur bestrahlt	1·(-)	1·(-)	1·(-)	1·	(±)	+	+		
auf 0,1 Th.H.									

Thioharnstoff wieder ausgewaschen wird, während der bereits in die Vakuole eingedrungene Thioharnstoff bei der nachfolgenden Bestrahlung auf

Tabelle 11. *Allium cepa*, *Innenepidermis*. Rasche Auswaschbarkeit des Thioharnstoffes (0,1 mol).

Nur die 30 Minuten Th.H.-Vorbehandlung zeigt nach 5 Minuten Auswaschen und Bestrahlung auf wassergetränktem Filterpapier noch eine geringe Schutzwirkung.

Vorbehandlung	Bestrahlungsdauer (min)						
	1/2	3/4	1	1 1/2	2	2 1/2	3
Kontrolle, H ₂ O	1·(-)	1·	-1·	+	+	+	+
30 Min. Th. H.	1·	1·	1·	1·(-)	1·	1·	-1·
30 Min. Th. H., 5 Min. H ₂ O . . .	1·	1·	1·	1·	+	+	+
15 Min. Th. H., 5 Min. H ₂ O . . .	1·	1·	-1	+	+	+	+
10 Min. Th. H., 5 Min. H ₂ O . . .	1·	1·	-1	+	+	+	+
5 Min. Th. H., 5 Min. H ₂ O . . .	1·(-)	1·	-1	+	+	+	+

wassergetränktem Filterpapier nicht rasch genug durch den Tonoplasten wieder ins Plasma austreten kann (Tab. 11).

3. Die Wirkung von Nachbehandlungen mit Thioharnstoff

Die Fähigkeit des Thioharnstoffes, fast augenblicklich in das Protoplasma (bzw. die Zellwand) der Innenepidermiszellen der Zwiebelschuppen einzutreten, ermöglicht den zeitlich scharf abgegrenzten experimentellen Nachweis, daß eine Strahlenschädigung nur verhindert bzw. abgeschwächt werden kann, wenn sich der Thioharnstoff zur Zeit der Bestrahlung in der Zelle befindet.

Die Aufhebung der Schutzwirkung einer sonst ausreichenden Vorbehandlung mit Thioharnstoff durch kurzes Auswaschen der Schnitte in Wasser hat dies nach der Seite vor der Bestrahlung schon gezeigt.

Tabelle 12. *Allium cepa*, Innenepidermis. Wirkungslosigkeit von Nachbehandlungen mit 0,1 mol Thioharnstoff verschieden lang nach der Bestrahlung.

Behandlung		Dauer der Bestrahlung (min)						
		1/2	3/4	1	1 1/2	2	2 1/2	3
Kontrolle. H ₂ O		1(-)	1-	±	+	+	+	+
30 Min. Th. H.-Vorbehandlung		1(-)	1-	1-	1-	1-	-1-	+
Bestr. auf H ₂ O, auschl. nach verschied. Zeiten für 30 Min. in Th. H.	sofort.	1(-)	1-	±	+	+	+	+
	nach 5 Min.	1(-)	1-	±	+	+	+	+
	nach 10 Min.	1(-)	1-	±	+	+	+	+
	nach 30 Min.	1(-)	1-	±	+	+	+	+
	nach 1 Stunde	1(-)	1-	±	+	+	+	+

In den folgenden Versuchen wurden die Schnitte ohne Vorbehandlung auf wassergetränktem Filterpapier bestrahlt und unmittelbar nachher bzw. nach verschieden langem Zwischenaufenthalt in Wasser für 30 Minuten in 0,1 mol Thioharnstoff gelegt. Anschließend wurden die Schnitte wieder in Wasser gebracht und wie immer 24 Stunden später auf ihren Lebenszustand geprüft.

In der Mehrzahl der Versuche war überhaupt keine Wirkung einer solchen Nachbehandlung zu beobachten (Tab. 12).

Der in Tab. 12 dargestellte, an streng vergleichbaren Epidermisstücken einer und derselben Zwiebel durchgeführte Versuch zeigte auch bei unmittelbarer Übertragung der auf Wasser bestrahlten Schnitte in 0,1 mol Thioharnstoff keine Schutzwirkung. Bei jeder Art von Nachbehandlung lag die Todesgrenze in genau gleicher Höhe wie bei den unvorbehandelten Kontrollen.

Nur in einigen wenigen Fällen konnte bei unmittelbarer Übertragung der auf Wasser bestrahlten Schnitte in 0,1 mol Thioharnstoff eine geringe

Schutzwirkung beobachtet werden. Sie findet in dem in Tab. 13 wiedergegebenen Versuch noch dadurch eine Stütze, daß auch ein 30 Minuten mit 0,1 mol Th.H. vorbehandelter, auf Th.H. bestrahlter und anschließend noch einmal für 20 Minuten in 0,1 mol Thioharnstoff gelegter Schnitt eine ganz kleine Erhöhung der Schutzwirkung gegenüber den nur 30 Minuten vorbehandelten, auf Thioharnstoff bestrahlten, aber dann in Wasser gebrachten Schnitt zeigte. Vielleicht stand diese feine Reaktion damit in Zusammenhang, daß es sich bei diesem Versuch um eine ganz besonders strahlenempfindliche Zwiebel (Kontrolle tot nach $\frac{1}{2}$ Minute Bestrahlung!) handelte.

Tabelle 13. *Allium cepa*, Innenepidermis, Beispiel eines Versuches mit einer geringen Schutzwirkung einer unmittelbar auf die Bestrahlung folgenden Nachbehandlung mit 0,1 mol Thioharnstoff.

Behandlung	Dauer der Bestrahlung (min)						
	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{3}{4}$	1	$1\frac{1}{4}$	$1\frac{1}{2}$	2
Kontrolle, H ₂ O	1(-)	+	+	+	+	+	+
30 Min. Th.H., bestr. auf Th.H.	1-	1-	1(-)	1-	-1-	(±)	±
30 Min. Th.H., bestr. auf Th.H., 20 Min. Th.H.	1(-)	1-	1(-)	1-	1.	1-	±
bestr. auf H ₂ O, dann 30 Min. Th.H.	1(-)	1-	±	+	+	+	+

Dieser geringen Schutzwirkung einer Nachbehandlung stehen aber auch einzelne Beobachtungen gegenüber, bei denen die nachbehandelten Schnitte sogar etwas stärker geschädigt waren als die vollkommen unbehandelten Kontrollen.

Im allgemeinen dürfen wir daher aus dieser Versuchsserie wohl den Schluß ziehen, daß der Thioharnstoff seine Schutzwirkung nur auszuüben vermag, wenn er sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der Zelle befindet.

4. Abhängigkeit der Schutzwirkung des Thioharnstoffes von seiner Konzentration

Die bisherigen Versuche, die durchwegs mit 0,1 mol Thioharnstoff durchgeführt worden waren, haben gezeigt, daß der Thioharnstoff schon nach kürzester Einwirkungszeit eine gewisse Schutzwirkung auszuüben vermag. Sie haben aber noch nichts darüber ausgesagt, ob sich der Grad der Schutzwirkung ändert, wenn die Behandlung mit stärker oder schwächer konzentrierten Thioharnstofflösungen vorgenommen wird.

Es wurden daher bei gleicher Vorbehandlungsdauer von 30 Minuten Versuche mit konzentrierteren und verdünnteren Thioharnstofflösungen angestellt. Dabei zeigte sich, daß 0,1 mol Thioharnstoff keineswegs die optimal schützende Konzentration ist. Bei kleinen Verschiedenheiten im einzelnen zeigte sich in allen Versuchen die Tendenz, daß durch höhere, aber noch nicht plasmolyseerregende Thioharnstoffkonzentrationen ein größerer Strahlenschutz zu erzielen war.

Tab. 14 gibt einen besonders gut gelungenen Versuch wieder, in dem Thioharnstofflösungen von 0,1 bis 0,5 mol auf ihre Schutzwirkung verglichen wurden. Bestrahlt wurde jeweils auf Filterpapier, das mit der betreffenden Konzentration getränkt war. Nach der Bestrahlung kamen die Schnitte gleich wieder in Wasser. Bei anderen Zwiebeln bewegte sich der durch 0,5 mol Thioharnstoff erzielte Schutz zwischen $4\frac{1}{2}$ und 6 Minuten Bestrah-

Tabelle 14. *Allium cepa*, *Innenepidermis*. Abhängigkeit der Schutzwirkung des Thioharnstoffes von seiner Konzentration.

Vorbehandlung (30 min)	Dauer der Bestrahlung (min)																		
	¼	½	¾	1	1½	2	2½	3	3½	4	4½	5	5½	6	6½	7	7½	8	9
Kontr., H ₂ O	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,1 mol Th.H.	1	1	1	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,2 mol Th.H.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,3 mol Th.H.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	+	+	+
0,4 mol Th.H.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+	+
0,5 mol Th.H.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	+

lungsdauer. In allen Fällen lag er aber wesentlich höher als nach Vorbehandlung mit 0,1 mol.

Umgekehrt ist mit 0,01 mol Thioharnstoff bereits die Konzentration unterschritten, durch die bei 30 Minuten langer Vorbehandlung noch ein merkbarer Strahlenschutz erzielt werden kann (Tab. 15).

Tabelle 15. *Allium cepa*, *Innenepidermis*. Abnahme der Schutzwirkung des Thioharnstoffes mit abnehmender Konzentration.

Vorbehandlung (30 min)	Dauer der Bestrahlung (min)									
	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{3}{4}$	1	$1\frac{1}{2}$	2	$2\frac{1}{2}$	3	$3\frac{1}{2}$	4
Kontrolle, H_2O	1(-)	1	1	±	+	+	+	+	+	+
0,5 mol Th.H.	1	1(-)	1(-)	1	1	1	1	1	1(-)	1(-)
0,1 mol Th.H.	1	1(-)	1	1	1	-1	+	+	+	+
0,05 mol Th.H.	1	1	1	1	1	+	+	+	+	+
0,01 mol Th.H.	1	1	1	±	+	+	+	+	+	+
0,005 mol Th.H.	1	1	1	±	+	+	+	+	+	+
0,001 mol Th.H.	1	1	1	±	+	+	+	+	+	+

Ein weiterer Versuch sei in diesem Zusammenhang noch angeführt, in welchem mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen werden: die Wirkung von 30 Minuten Vorbehandlung mit 0,1 mol Thioharnstoff, die einer Bestrahlung nur auf 0,5 mol Thioharnstoff ohne Vor- oder Nachbehandlung und die Wirkung einer unmittelbar nach Bestrahlung auf Wasser erfolgenden 30 Minuten langen Nachbehandlung mit 0,5 mol Thioharnstoff. Der Versuch bestätigt, daß trotz stärkerer Schutzwirkung des 0,5 mol Thioharn-

stoffes auch mit dieser Konzentration durch Nachbehandlung kein Schutz zu erzielen ist, ja es erwiesen sich die nachbehandelten Schnitte sogar etwas stärker geschädigt als die unbehandelten Kontrollen (Tab. 16).

Als Ergebnis der Versuche über die Abhängigkeit der Schutzwirkung des Thioharnstoffes von seiner Konzentration kann somit festgehalten wer-

Tabelle 16. *Allium cepa*, *Innenepidermis*. Die Wirkung von 0,5 mol Thioharnstoff nur während der Bestrahlung und als Nachbehandlung geboten.

Behandlung	Dauer der Bestrahlung (min)													
	¼	½	¾	1	1 ½	2	2½	3	3½	4	4½	5	5½	6
Kontrolle, H ₂ O	1·	1·(-)	1·	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30 Min. Th. H., bestr. auf Th. H.	1·	1·	1·	1·	1·	1·	-1	+	+	+	+	+	+	+
nur auf 0,5 Th. H. bestrahlt	1·	1·	1·	1·	1·(-)	1·(-)	1·(-)	1·	-1	-1	-1	-1	-1	-1
auf H ₂ O bestrahlt, dann 30 Min. 0,5 Th. H.	1·	1·	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

den: Bei 30 Minuten langer Vorbehandlung setzt die Schutzwirkung des Thioharnstoffes etwa ab 0,05 mol ein und nimmt bis 0,5 mol zu, womit beinahe schon der plasmolyseerregende Konzentrationsbereich erreicht ist.

Tabelle 17. *Allium cepa*, *Innenepidermis*. Andauer der Schutzwirkung einer 30 Min. langen Vorbehandlung mit 0,1 mol Thioharnstoff.

(Die mit WG₅ abgedeckten Kontrollhälften aller Schnitte waren am 4. Tag noch vollständig lebend.)

Vorbe- handlung	Zeit nach der Bestrah- lung	Dauer der Bestrahlung (min)					
		¼	½	¾	1	1 ½	2
Kontr. H ₂ O	nach 24h	1	1	-1	+	+	+
	nach 2d	1	1	+	+	+	+
	nach 3d	1	±	+	+	+	+
	nach 4d	1	±	+	+	+	+
0,1 Th. H. (30 min)	nach 24h	1	1	1	1	-1	+
	nach 2d	1	1	1	1	-1	+
	nach 3d	1	1	1	1	±	+
	nach 4d	1	1	1	1	±	+

5. Andauer der Schutzwirkung

Bisher wurde die Schutzwirkung des Thioharnstoffes stets nur auf den Lebenszustand der Zellen 24 Stunden nach der Bestrahlung bezogen. In einigen Versuchen wurde aber auch die Frage verfolgt, ob dieser Schutz dauernd anhält oder ob bei weiterem Belassen der Schnitte in Wasser später doch noch Schädigungen auftreten können.

Mit den Innenepidermen der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* konnten die Versuche nicht allzulang ausgedehnt werden, da die dünnen, nährstoff-armen Epidermen nach einigen Tagen auch ohne Bestrahlung abzusterben beginnen. Tab. 17 zeigt einen durch 4 Tage beobachteten Versuch, aus dem hervorgeht, daß die mit 0,1 mol Thioharnstoff 30 Minuten lang vorbehandelten Schnitte nach 3 bis 4 Tagen zwar noch eine kleine Zunahme der Schädigung erfahren, daß aber die Schutzwirkung im wesentlichen erhalten bleibt.

In einem anderen, nur über 3 Tage ausgedehnten Versuch hatte sich bei der nichtvorbehandelten, auf Wasser bestrahlten Kontrolle die Todesgrenze

Tabelle 18. *Allium cepa*, Außenepidermis einer roten Zwiebel. Die Zahlen bedeuten die % lebender Zellen.

(Die mit WG₅ abgedeckten Hälften aller Schnitte leben am 5. Tage noch nahezu 100%ig.)

Vorbehandlung		Dauer der Bestrahlung (Minuten)																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Kontrolle H ₄ O	nach 24 ^h	1	1	1	—1	+	+	+	+									
	nach 2 ^d	1	1	—1	+	+	+	+	+									
	nach 3 ^d	1	—1	+	+	+	+	+	+									
	nach 5 ^d	95	80	+	+	+	+	+	+									
30 min 0,3 Thio- harnstoff	nach 24 ^h	1	1	1	1	95	95	90	90	90	80	90	50	60	70	95	95	85
	nach 2 ^d	1	1	1	1	95	95	90	90	90	60	90	50	60	70	70	85	80
	nach 3 ^d	1	—1	96	95	95	95	80	90	90	20	90	30	60	30	70	80	60
	nach 5 ^d	90	80	90	80	80	90	70	85	90	10	80	20	40	20	40	60	50

von 1. bis zum 5. Tag nicht verschoben (sie lag bei ¼ Minuten Bestrahlung), bei den mit Thioharnstoff vorbehandelten Schnitten war sie von 2 min am 1. Tag auf 1 ½ min am 3. Tag herabgesunken. Im wesentlichen war also auch hier die Schutzwirkung erhalten geblieben.

Ein durch 5 Tage beobachteter Versuch mit Schnitten der Außenepidermis einer roten Zwiebel (2. lebende Schuppe von außen, durchschnittliche Zellwanddicke 10,3 μ) zeigte einerseits bei den nichtvorbehandelten wie bei den mit Thioharnstoff (0,3 mol, 30 min) vorbehandelten Schnitten im Laufe der Tage eine Zunahme der Strahlenschädigung, andererseits aber doch ein wesentliches Erhaltenbleiben der Schutzwirkung (Tab. 18).

Auffallend ist bei den Außenepidermen der Zwiebelschuppen die gegenüber den Innenepidermen weit größere Unregelmäßigkeit der Schutzwirkung. Es mag dies an einer, infolge ungleicher Membrandicke von vornherein gegebenen, verschiedenen Strahlenschädigung der einzelnen Zellen gelegen sein (vgl. Abschn. I), oder auch an einem durch verschiedene Schnittdicke bedingtem ungleichmäßigem Eindringen des Thioharnstoffes. Auch verschieden starke mechanische Beanspruchung bei der Herstellung der Schnitte kann vielleicht das Reaktionsvermögen des Protoplasmas beeinflussen. Während die Innenepidermen nach Infiltration mit Wasser einfach von den Schuppen abgehoben werden können, müssen die Außenepidermen

mit einer Rasierklinge geschnitten werden. Solche Schädigungen können vielleicht als Ursache dafür angesehen werden, daß z. B. in dem in Tab. 18 dargestellten Versuch 24 Stunden nach 12 Minuten Bestrahlung in dem mit Thioharnstoff vorbehandelten Schnitt nur 50% lebten, während in den 15 und 16 Minuten bestrahlten Schnitten noch 95% der Zellen am Leben waren. Die in den Tabellen angegebenen Prozentzahlen sind Schätzungen, die sich verhältnismäßig genau ausführen lassen, da sich die toten, entfärbten Zellen deutlich von den lebenden, anthokyanhaltigen abheben.

Bemerkenswert ist, daß in den mit Thioharnstoff vorbehandelten Schnitten einzelne Zellen bis herunter zur Todesgrenze der unbehandelt bestrahl-

Tabelle 19. Rotkraut. Epidermis der Mittelrippe der Blattunterseite. Andauer der Schutzwirkung einer 30 Minuten langen Vorbehandlung mit 0,1 mol Thioharnstoff durch 14 Tage.

Vorbehandlung		Bestrahlungsdauer (min)						
		1½	1¾	2	2½	3	3½	4
Kontrolle H ₂ O	nach 24h	1	1	1	-1	-1	-1	+
	nach 2d	1	1	1	-1	±	±	+
	nach 14d	1	1	1	-1	±	±	+
30 min 0,1 Th.H.	nach 24h	1	1	1	-1	-1	-1	-1
	nach 2d	1	1	1	-1	-1	-1	±
	nach 14d	1	1	1	-1	-1	-1	±

ten Kontrollen absterben, während die große Mehrzahl der Zellen einen über das Vierfache der Letalgrenze der Kontrollen hinausgehenden Strahlenschutz erfährt.

Auch beim Rotkraut (Epidermis der Mittelrippe der Blattunterseite) konnte eine sehr lange anhaltende Schutzwirkung einer 30-Minuten-Vorbehandlung mit 0,1 mol Thioharnstoff beobachtet werden, aber auch hier waren in den vorbehandelten Schnitten vereinzelte Zellen bis herunter zur letalen Bestrahlungsdauer der unvorbehandelt bestrahlten Kontrollen abgestorben (Tab. 19).

Die Dauerbeobachtungen an verschiedenen Objekten ergaben somit, daß die Schutzwirkung des Thioharnstoffes im wesentlichen anhält bzw. daß die Todesgrenze im Verlauf mehrerer Tage nur nach den längsten Bestrahlungszeiten noch etwas absinkt.

6. Wirkung des Thioharnstoffes auf die plasmatischen Veränderungen nach subletaler Bestrahlung

a) Plasmaströmung

Wie im Abschnitt I (S. 329) ausgeführt, wirkt schon eine subletale UV-Bestrahlung hemmend auf die Plasmaströmung der Zwiebelinnenepidermen. Es sei nun noch einmal auf die Tabellen 8—16 verwiesen, in denen auch der Grad der Plasmaströmung mit angegeben ist (bzgl. Zeichen s. Tab. 8).

Diesen Tabellen ist zu entnehmen, daß sich der Strahlenschutz des Thioharnstoffes auch auf die Plasmaströmung erstreckt. Wenn zwar in den mit Thioharnstoff vorbehandelten Schnitten nach den längeren Bestrahlungszeiten auch eine Verlangsamung der Plasmaströmung und schließlich ein Übergang zur BMB eintritt, so reicht die kräftige Plasmaströmung doch deutlich in den geschützten Bereich herauf.

Ein Vergleich der einzelnen Tabellen zeigt hinsichtlich der Erhaltung der Plasmaströmung bei verschiedenen Versuchen gewisse Unterschiede. Diese sind wohl als Ausdruck eines verschiedenen physiologischen Zustandes der betreffenden Zwiebelepidermen anzusehen. So einfach die Verhältnisse in einer Zwiebelepidermiszelle auch erscheinen mögen, so sehr steht auch ihr Reaktionsvermögen unter dem Einfluß verschiedenster innerer und äußerer Bedingungen. Man wird kaum zwei Zwiebeln finden, die sich wirklich vollkommen gleich verhalten. Von diesen graduellen Unterschieden abgesehen, ist aber ein längeres Erhaltenbleiben der Plasmaströmung in dem durch Thioharnstoffvorbehandlung gegen die Wirkung der UV-Strahlen geschützten Bereich in allen Fällen klar zu erkennen.

b) Permeabilitätsverhältnisse

Zu den empfindlichsten, immer wieder mit Regelmäßigkeit zu beobachtenden Reaktionen des Plasmas der Innenepidermis der Zwiebelnsschuppen gegen noch weit subletale UV-Bestrahlungen gehört die Erhöhung der Wasserpermeabilität (Biebl 1942 a, b). Sie äußert sich in einem schnelleren Plasmolyseeintritt in der bestrahlten Schnitthälfte gegenüber der durch WG₅ abgedeckten Kontrollhälfte. Damit verbunden ist eine Viskositätsverminderung durch die Bestrahlung, die sich in einer schnelleren und schöneren Rundung der vollbestrahlten Protoplasten bei Plasmolyse ausdrückt. Die auffallende Hemmung der Glycerinpermeabilität in den Außenepidermen der Zwiebelnsschuppe durch subletale UV-Bestrahlung wurde schon erwähnt (Abschn. I). Hinzu kommt schließlich noch eine erhöhte Exosmose von Zellsaftstoffen aus den subletal bestrahlten Geweben bei mehrtägiger Wässerung (Biebl 1942 b).

Diese Plasmareaktionen treten in den Zwiebel-Innenepidermiszellen (innerhalb 24 Stunden letale Bestrahlungsdauer $\frac{3}{4}$ —1 Minute) schon nach 15 und 30 Sekunden UV-Bestrahlung ein. Es war zu erwarten, daß diese Plasmaeigenschaften den empfindlichsten Test für die Wirkung des Thioharnstoffes im Bereich sublethaler Bestrahlung ergeben würden.

Es war nun eine große Überraschung, daß alle diese strahlenbedingten Permeabilitätsänderungen durch den Thioharnstoff in keiner Weise beeinflusst wurden. Selbst in Epidermen, in denen die Todesgrenze der Zellen durch die Thioharnstoffvorbehandlung um das Drei- bis Vierfache hinaufgerückt werden konnte, war nach 15 Sekunden Bestrahlung in gleicher Weise wie bei den ohne Vorbehandlung auf Wasser bestrahlten Schnitten nach Einlegen in eine hypertoniische Lösung ein früherer Plasmolyseeintritt zu beobachten, als bei den während der Bestrahlung mit dem WG₅-Filter abgedeckten Hälften derselben Schnitte. Der Strahlenschutz des Thioharnstoffes, der sich deut-

lich in einer Hinaufsetzung der Todesgrenze auswirkte, kam hinsichtlich der Erhöhung der Wasserpermeabilität durch die UV-Bestrahlung nicht zum Ausdruck. Diese Tatsache konnte in sämtlichen Versuchen beobachtet werden.

Tabelle 20. *Allium cepa*, *Innenepidermis*. Plasmolyseeintritt und Plasmolyseform 4 Stunden nach 15 und 30 Sekunden UV-Bestrahlung auf Wasser (Kontrolle) und nach 30 Minuten Vorbehandlung mit 0,1 mol Thioharnstoff.

Vorbehandlung	Dauer der Bestrahlung	Plasmolyse in 1,5 mol Glycerin	
		bestrahlt	abgedeckt mit WG ₅
Kontrolle, H ₂ O	15 sec	nach ½' Plasmolysebeginn	nach ½' noch keine Plasmolyse
		nach 1½' schon starke, häufig bikonvexe Plasmolyse	nach 1½' schwache Plasmolyse an den Ecken
30 min 0,1 Th. H.	15 sec	nach ½' Plasmolysebeginn	nach ½' noch keine Plasmolyse
		nach 1' schon starke Plasmolyse	nach 1' Plasmolyse-eintritt
Kontrolle, H ₂ O	30 sec	nach ¾' Plasmolysebeginn	nach ¾' noch keine Plasmolyse
		nach 1' schon viel bikonvex	nach 1' Plasmolysebeginn
		nach 7' alles bikonvex	nach 7' konkave und zipfelige Plasmolysebilder
30 min 0,1 Th. H.	30 sec	nach ¾' schon groß-buchtige bis konvexe Plasmolysen	nach ¾' Plasmolysebeginn
		nach 2' fast alles bikonvex	nach 2' eckige, meist seitl. konkave Plasmolyseformen

Ein Versuch sei als Beispiel vorgeführt: Innenepidermisstücke einer und derselben Zwiebelschuppe wurden teils auf Wasser (Kontrolle), teils nach 30 Minuten Vorbehandlung mit 0,1 mol Thioharnstoff auf mit der gleichen Lösung getränktem Filterpapier 15 und 20 Sekunden lang bestrahlt. 4 Stunden und 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden die Schnitte, deren jeder während der Bestrahlung zur Hälfte mit einem WG₅-Filter abgedeckt war, in 1,5 mol Glycerin plasmolysiert. Tab. 20 gibt die Versuchsablesung 4 Stunden nach der Bestrahlung wieder:

Das Ergebnis von Plasmolyseversuchen 24 Stunden nach der Bestrahlung war genau das gleiche wie 4 Stunden nach der Bestrahlung. Auch nach 24 Stunden trat, unbeeinflusst von der Vorbehandlung mit Thioharnstoff, stets in den vollbestrahlten Hälften der Schnitte die Plasmolyse schneller

ein als in den durch das WG_5 abgedeckten Hälften. Abb. 6 zeigt die 15 Sekunden bestrahlte und Abb. 7 die durch das WG_5 -Filter abgedeckte

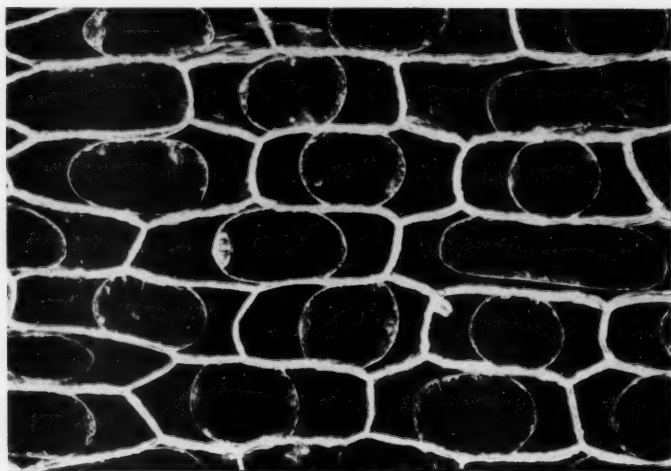


Abb. 6. *Allium cepa*, Innenepidermis. Nicht vorbehandelte Kontrolle 24 Stunden nach 15 sec UV-Bestrahlung, 5 min nach Einlegen in 1,5 mol Glycerin. Vollbestrahlte Schnitthälfte: bikonvexe Plasmolysen.



Abb. 7. *Allium cepa*, Innenepidermis. Nicht vorbehandelte Kontrolle 24 Stunden nach 15 sec UV-Bestrahlung, 5 min nach Einlegen in 1,5 mol Glycerin. Mit WG_5 abgedeckte Schnitthälfte: konkave bis zipfelige Plasmolysen.

Hälfte des nicht vorbehandelten, auf Wasser bestrahlten Kontrollschnittes, und Abb. 8 die 15 Sekunden bestrahlte und Abb. 9 die durch das WG₅-

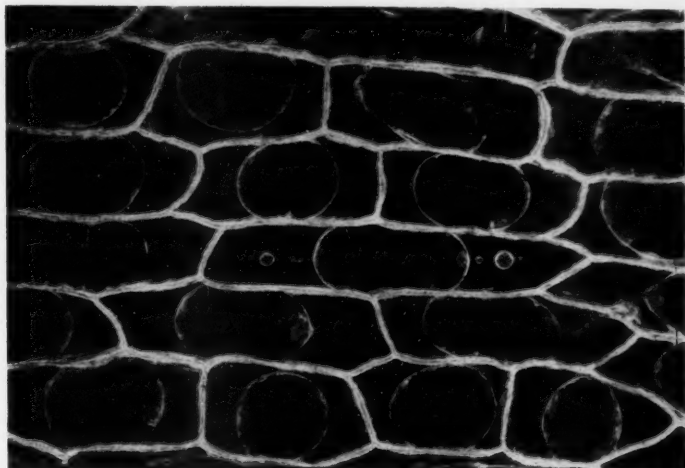


Abb. 8. *Allium cepa*, Innenepidermis. 30 min mit 0,1 mol Thioharnstoff vorbehandelt und auf Th.H. bestrahlt. 24 Stunden nach 15 sec UV-Bestrahlung. 5 min nach Einlegen in 1,5 mol Glycerin. Vollbestrahlte Schnitthälfte: bikonvexe Plasmolysen.

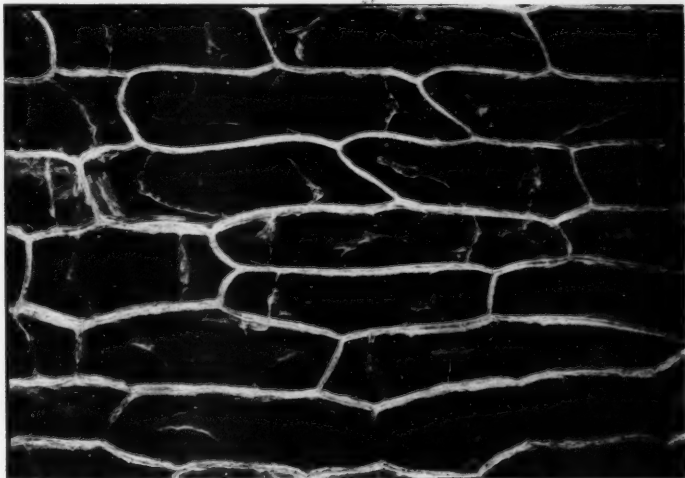


Abb. 9. *Allium cepa*, Innenepidermis. 30 min mit 0,1 mol Thioharnstoff vorbehandelt und auf Th.H. bestrahlt 24 Stunden nach 15 sec UV-Bestrahlung. 5 min nach Einlegen in 1,5 mol Glycerin. Mit WG₅ abgedeckte Schnitthälfte: konkave bis zipfelige Plasmolysen.

Filter abgedeckte Hälfte des 30 Minuten mit 0,1 mol Thioharnstoff vorbehandelten und auf Thioharnstoff bestrahlten Schnittes. Die Bilder entsprechen einander vollkommen. Trotz der Vorbehandlung mit Thioharnstoff, der die Todesgrenze weit nach oben verschob, ist hinsichtlich der Strahlenwirkung auf die Schnelligkeit des Plasmolyseeintrittes (d. h. der Wasserpermeabilität) und die Plasmolyseform (d. h. Herabsetzung der Viskosität bzw. des Haftvermögens) kein Einfluß des Thioharnstoffes zu bemerken.

Eine ähnliche, durch die Thioharnstoffvorbehandlung unbeeinflussbare UV-Strahlenwirkung ist die Hemmung der Glycerinperme-

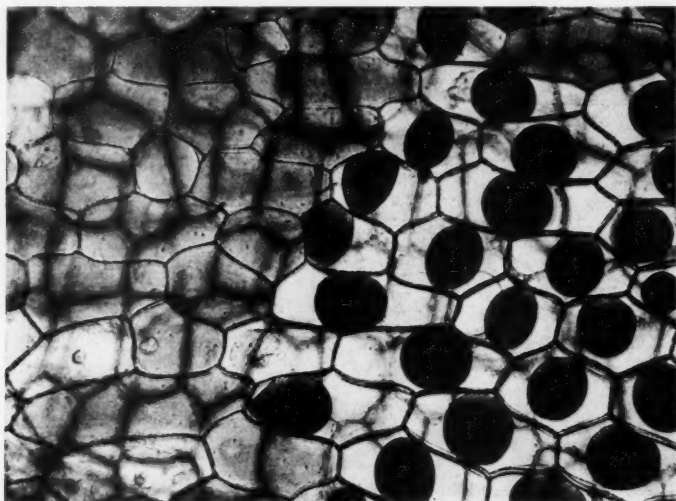


Abb. 10. *Allium cepa* (rote Sorte), Außenepidermis. Unvorbehandelte Kontrolle 48 Stunden nach 4 min Bestrahlung eingelegt in 1,0 mol Glycerin. Nach 2½ Stunden ist die durch WG₅ abgedeckte Hälfte infolge Glycerineintrittes deplasmolysiert (links), die vollbestrahlte Hälfte hingegen infolge Hemmung der Glycerinpermeabilität weiterhin bikonvex plasmolysiert (rechts).

abilität in den Zellen der Außenepidermis der Zwiebelschuppen von *Allium cepa*. Die Abb. 10 und 11 stammen aus einem Versuch, bei dem die Todesgrenze der unbehandelten Kontrollschnitte innerhalb von 24 Stunden bei 6 Minuten Bestrahlung gelegen war. Die mit 0,3 mol Thioharnstoff vorbehandelten Schnitte lebten nach 9 Minuten langer Bestrahlung zur Gänze. Längere Bestrahlungszeiten wurden in diesem Versuch nicht geprüft. Entsprechend dem in Tab. 18 dargestellten Versuch ist die Todesgrenze nach Thioharnstoffvorbehandlung aber noch wesentlich höher anzunehmen.

Trotzdem zeigen die 4 Minuten bestrahlten Schnitte, sowohl aus der unvorbehandelten Kontrolle wie aus der mit Thioharnstoff vorbehandelten Reihe, 48 Stunden nach der Bestrahlung hinsichtlich ihrer Glycerinpermeabilität ein vollkommen gleiches Verhalten. Die Schnitte wurden in 1,0 mol

Glycerin eingelegt und 2½ Stunden später photographiert. Die während der Bestrahlung durch das WG₅-Filter abgedeckt gewesenen Schnitthälften beider Serien sind durch Glycerineintritt völlig deplasmolysiert. In den bestrahlten Hälften aber zeigt sich bei den Kontrollen (Abb. 10) wie bei den mit Thioharnstoff vorbehandelten Schnitten (Abb. 11) die gleiche Hemmung der Glycerinpermeabilität. In beiden Fällen befinden sich die Protoplaste noch im Zustand stark bikonvexer Plasmolyse.

Schließlich seien auch noch einige Exosmose-Versuche angeführt. Die

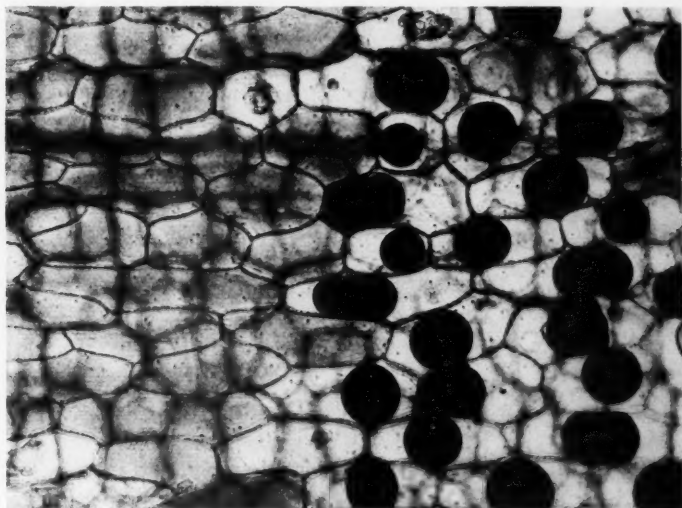


Abb. 11. *Allium cepa* (rote Sorte), Außenepidermis. 50 min mit 0,5 mol Thioharnstoff vorbehandelt. Im übrigen wie Abb. 10.

Exosmose wurde an Zwiebelschuppen-Innenepidermen durch plasmometrische Bestimmung des osmotischen Wertes in 0,8 mol Glukose zu verschiedenen Zeiten gemessen.

Zu den drei in Tab. 21 dargestellten Versuchen wurden Schnitte von verschiedenen Zwiebeln und Schuppen verwendet. Streng vergleichbar ist immer nur das Paar „unter WG₅“ und „bestrahlt“, das sich jeweils auf ein und denselben Schnitt bezieht. In allen Fällen zeigt sich aber, mit der Dauer der Bestrahlung zunehmend, in der bestrahlten Hälfte ein niedrigerer osmotischer Wert als in der abgedeckten, d. h. es müssen aus der bestrahlten Hälfte Zellsaftstoffe exosmiert sein. Auch diese strahlenbedingte Exosmose konnte durch die Thioharnstoffvorbehandlung nicht verhindert werden.

Die Tatsache der Nichtbeeinflussbarkeit dieser schon durch schwache, subletale UV-Bestrahlungen bewirkten Permeabilitätsänderungen durch Thioharnstoff führt zu dem Schluß, daß es sich hier um andere Strahlenwirkun-

gen, bzw. um die Wirkung anderer Bereiche des kurzwelligen UV handelt, als bei jenen, die zum Zelltod führen. Der „Strahlenschutz“ des Thioharnstoffes bezieht sich somit nur auf die zum Zelltod führenden Wirkungen, nicht aber auf jene Veränderungen, die die Permeabilitätsverhältnisse beeinflussen.

Tabelle 21. *Allium cepa*, Innenepidermis, Exosmose von Zellsaftstoffen nach $\frac{1}{2}$ Minute UV-Bestrahlung während nachfolgender Wässerung.

Kein Unterschied zwischen den nichtvorbehandelten und den 30 min mit 0,1 mol Thioharnstoff vorbehandelten Schnitten.

Zeitpunkt nach der Bestrahlung	Osmotischer Wert			
	Kontrolle, H ₂ O		Vorbehandelt (0,1 Th. H.)	
	unter WG ₅	voll bestrahlt	unter WG ₅	voll bestrahlt
3h	0,28	0,27	0,30	0,29
3d	0,40	tot	0,43	0,29
2d	0,32	0,28	0,32	0,28
3d	0,32	0,27	0,29	0,24
24h	0,33	0,32	0,31	0,30
2d	0,37	0,32	0,40	0,25
3d	0,41	tot	0,41	0,32

c) Morphologische Veränderungen an den Chondriosomen und Leukoplasten

Gleiches wie für die Permeabilitätsverhältnisse gilt auch für die als Folge subletaler UV-Bestrahlung auftretenden morphologischen Veränderungen an den Chondriosomen und Leukoplasten (vgl. Biebl und Url 1958). Auch diese werden durch die Thioharnstoffbehandlung nicht merklich beeinflusst. Sie treten an den vorbehandelten Schnitten nach den gleichen Bestrahlungszeiten auf wie an den unvorbehandelten Kontrollen.

In der abgedeckten Hälfte, sowohl der Kontrollen wie der mit Thioharnstoff vorbehandelten Schnitte, zeigen die Chondriosomen während 24stündiger Wässerung eine deutliche Neigung sich zu verlängern (vgl. Alexandrov 1960). Neben den immer vorhandenen dicken Kurzstäbchen finden sich in großer Zahl im strömenden Plasma sich schlängelnde, dünne, lange, schmierige Formen. Die Leukoplasten sind in den abgedeckten Hälften meist zipfelig ausgezogen und zu amöboiden Formveränderungen befähigt. Dieser Zustand soll in der folgenden Tabelle 22 als „normal“ bezeichnet werden.

Die erste Strahlenwirkung äußert sich in einer Verkürzung der Chondriosomen. Sie bilden nur mehr Kurzstäbchen und ovale Formen. Die Leukoplasten ziehen ihre langen Ausläufer ein und haben meist nur mehr einseitig oder auch beiderseits kurz ausgezipfelte, rundliche Formen. In der folgenden Tabelle soll dieses Stadium mit dem Schlagwort „verkürzt“ gekennzeichnet sein.

Die stärkste noch intravitale Strahlenwirkung äußert sich in einer vollkommenen Rundung der Chondriosomen und ebenso einer weitgehenden Rundung der Leukoplasten, in denen es häufig zur Bildung einer großen Vakuole kommt. Dieses Stadium soll „gerundet“ benannt werden.

Tab. 22 gibt die Verhältnisse in einem bestimmten Versuch wieder, der, trotz geringer individueller Abweichungen, als repräsentativ für die auch in allen anderen Versuchen gemachten Beobachtungen gelten kann.

Tabelle 22. *Allium cepa*, Innenepidermis. Wirkung der Bestrahlung auf die Form der Chondriosomen und Leukoplasten (24 Stunden nach der Bestrahlung).

Bestrahlungsdauer (min)	Form der Chondriosomen und Leukoplasten			
	Kontrolle, H ₂ O	Vorbehandelt 30' 0,1 Th.H.	Vorbehandelt 30' 0,3 Th.H.	Nur bestrahlt auf 0,5 Th.H.
1/4	normal	normal	normal	normal
1/2	etwas verkürzt	etwas verkürzt	normal	normal
3/4	gerundet	verkürzt bis gerundet	verkürzt bis gerundet	verkürzt bis gerundet
1	teilw. tot	gerundet	gerundet	gerundet
1 1/2	tot	gerundet	gerundet	gerundet
2	tot	gerundet	gerundet	gerundet
2 1/2		gerundet	gerundet	gerundet
3		tot	gerundet	gerundet
3 1/2		tot	gerundet	gerundet
4			gerundet	gerundet
4 1/2			gerundet	gerundet
5			teilw. tot	gerundet
6				gerundet

Man wird diese strahlenbedingten Formveränderungen der Chondriosomen und Leukoplasten, die sich bei den ohne und nach Vorbehandlung mit Thioharnstoff bestrahlten Innenepidermen der Zwiebelschuppen kaum unterscheiden, wohl wiederum dem durch Thioharnstoff unbeeinflussbaren Bereich der kurzwelligen UV-Bestrahlung zuschreiben dürfen.

IV. Die UV-Absorption des Thioharnstoffes

Die mit der Thioharnstoffkonzentration rasch zunehmende, bei Vorbehandlung der Schnitte mit 0,5 mol Thioharnstoff bis auf das Achtfache der Letaldosis ansteigende Schutzwirkung (vgl. Tab. 14) ließ es äußerst zweifelhaft erscheinen, daß es sich hierbei um einen rein chemischen Strahlenschutz handelt.

Um die Frage der „konkurrierenden Absorption“ des Thioharnstoffes zu prüfen, wurde einerseits mittels eines Beckmann Spektralphotometers die UV-Transmission verschiedener Thioharnstoffkonzentrationen bestimmt, und wurden andererseits Filterversuche vorgenommen, in denen die auf

wassergetränktem Filterpapier liegenden, unvorbehandelten Zwiebel-Innenepidermen, zur Hälfte mit einer 1 cm hohen, mit verschiedenen Thioharnstofflösungen gefüllten Quarzküvette bedeckt, bestrahlt wurden.

Ausgehend von der Annahme, daß in der imbibierten Zellwand und eventuell auch im Cytoplasma selbst die zur Vorbehandlung verwendeten 0,1, 0,2 und 0,5 mol. Thioharnstofflösungen nur in sehr geringer Schichtdicke, maximal vielleicht 5 bis 10 μ , vorhanden sein können, wurden in den 1 cm tiefen Quarzküvetten des Beckmann Spektralphotometers und in der gleich tiefen Filterküvette entsprechend stärkere Verdünnungen verwendet. Einer 10 μ dicken 0,1 mol. Thioharnstofflösung entspricht in 1 cm Schichtdicke eine Konzentration von 10^{-4} mol, einer 10 μ dicken 0,5 mol. Schichte eine Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ mol. Bei Bezug auf eine 5 μ dicke 0,1 und 0,5 mol. Thioharnstoffschicht waren die auf 1 cm Schichtdicke berechneten Konzentrationen für 10 μ noch einmal 1 : 1 zu verdünnen.

Tabelle 23. *Allium cepa*, Innenepidermis: Schutz durch Küvettenfilter, bzw. Vorbehandlung mit verschiedenen Thioharnstoffkonzentrationen.

Art des Versuchs		Dauer der Bestrahlung (min)											
		1/2	3/4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kontrolle, H ₂ O		1	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30 min Vor- handlung	0,1 mol Th.H.	1	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,2 mol Th.H.	1	1	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+
	0,5 mol Th.H.	1	1	1	1	1	1	1	1	±	±	+	+
Quarzküvetten Filterung berechnet auf Schichtdicke	5 μ	0,1 mol Th.H	1	1	1	±	+	+	+	+	+	+	+
		0,2 mol Th.H.	1	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+
		0,5 mol Th.H.	1	1	1	1	1	1	+	+	+	+	+
	10 μ	0,1 mol Th.H.	1	1	1	1	+	+	+	+	+	+	+
		0,2 mol Th.H.	1	1	1	1	1	1	±	+	+	+	+
		0,5 mol Th.H.	1	1	1	1	1	1	1	1	±	±	+

Tab. 23 zeigt das Ergebnis eines solchen mit Innenepidermen der Zwiebel-*schuppe* von *Allium cepa* vorgenommenen Küvettenfilterversuchs im Vergleich zu der Schutzwirkung einer 30 Minuten langen Vorbehandlung der Schnitte mit 0,1, 0,2 und 0,5 mol. Thioharnstoff. Der Versuch wurde mit streng vergleichbaren Epidermen ein und derselben Zwiebel durchgeführt. Die vorbehandelten Schnitte lagen während der Bestrahlung auf mit den entsprechenden Konzentrationen getränktem Filterpapier und waren wie stets an der Oberseite mit einem Filterpapier abgesaugt worden, so daß nur der in der Zelle (Zellwand oder Protoplast) vorhandene Thioharnstoff wirksam werden konnte.

Das Versuchsergebnis weist klar auf eine sehr starke, wenn nicht ausschließliche Schutzwirkung durch die UV-Absorption des Thioharnstoffes hin. Unter Zugrundelegung einer 5 μ dicken Thioharnstoffschicht war die Schutzwirkung im Küvetten-Filterversuch etwas geringer als die der Vor-

behandlung, bei Annahme einer $10\ \mu$ dicken Thioharnstoffschicht war sie bei 0,1 mol gleich, bei 0,2 und 0,5 mol größer als bei den vorbehandelten Schnitten.

Abb. 12 stellt die mit dem Beckmann-Spektralphotometer gemessenen UV-Transmissionskurven einer $10\ \mu$ dicken 0,1, 0,2 und 0,5 mol. Thioharn-

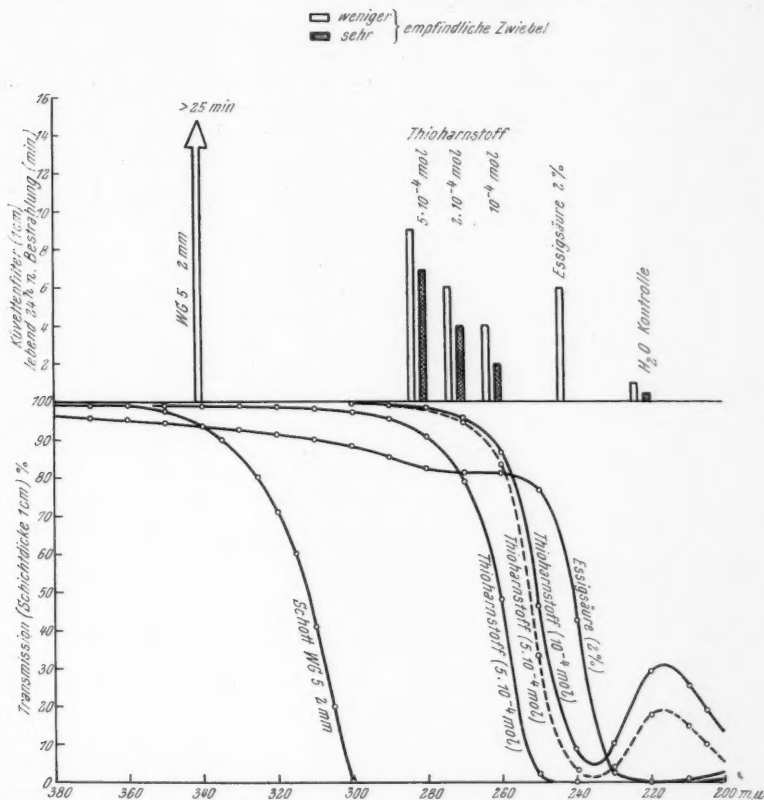


Abb. 12. UV-Transmission verschieden konzentrierter Thioharnstofflösungen und deren Filterwirkung bei UV-Bestrahlung von Zwiebel-Innenepidermen. (Verglichen mit Transmission und Filterwirkung von Schott WG 5 und 2% Essigsäure.)

Korrektur zu Abb. 12: — — — — = Thioharnstoff ($2 \cdot 10^{-4}$ mol).

stofflösung den Ergebnissen von zwei Küvettenfilterversuchen mit den gleichen Konzentrationen gegenüber. Die zwei Versuche beziehen sich auf Zwiebelschuppen-Innenepidermen verschieden UV-empfindlicher Zwiebeln. Bei der einen wurden die unbehandelten, auf Wasser bestrahlten Kontrollen schon durch eine Bestrahlungsdauer von einer halben Minute, bei der anderen erst durch eine Bestrahlung von einer Minute innerhalb von 24 Stunden

abgetötet. Dem entsprachen auch in den Küvettenversuchen ein verschieden hoher Schutz, bzw. verschieden lange Bestrahlungszeiten.

In Abb. 12 ist zum Vergleich auch die Transmission des in allen vorangegangenen Versuchen zur Abdeckung der Kontrollhälfte jedes Schnittes verwendeten WG₂-Glasfilters eingetragen. Eine Dauerbestrahlung unter diesem zeigte, daß auch nach der längsten verwendeten Bestrahlungszeit von 25 Minuten die Zellen noch nicht erkennbar geschädigt waren.

Zur Abgrenzung nach der kurzwelligen Seite wurde auch die Transmission einer 1 cm dicken Schichte von 2% Essigsäure gemessen und ein Küvettenfilterversuch mit der gleichen Lösung durchgeführt. Zu diesem Versuch wurde dieselbe unempfindliche Zwiebel verwendet wie bei dem einen der beiden abgebildeten Thioharnstoffversuche. Die Schutzwirkung des 2% Essigsäure-Küvettenfilters war gleich der Wirkung des 0,2 mol. (berechnet auf 10 μ Schichtdicke) Thioharnstoff-Küvettenfilters. Sie war aber größer als die des 0,1 mol. (berechnet auf 10 μ Schichtdicke) Thioharnstoff-Küvettenfilters.

Der Verlauf der Transmissionskurven der verwendeten Lösungen gibt die Erklärung: Eine 10 μ dicke Schicht von 0,1 mol. Thioharnstoff ($= 10^{-4}$ mol bei 1 cm Schichtdicke) zeigt unterhalb von 230 m μ mit einem Maximum bei etwa 215 m μ noch einmal eine recht beträchtliche Transmission.

Versuche mit anderen Substanzen, deren Lösungen ähnliche Transmissionskurven besitzen und über die in einer nachfolgenden Arbeit berichtet werden soll, bestätigten diese Beobachtung, daß den kürzestwelligen Anteilen des UV-Lichtes eine besonders starke Schadwirkung zukommt. In diesem kürzestwelligen Bereich unserer UV-Quelle ist aber die Möglichkeit zu radiochemischen Zerlegungen, zur Bildung von Ionen, Radikalen und Peroxyden zweifellos in erhöhtem Maße gegeben, so daß speziell für diesen Bereich auch chemische Schutzwirkung bestimmter Stoffe nicht von der Hand zu weisen ist. Doch tritt diese jedenfalls bei Substanzen nach Art des Thioharnstoffes gegenüber der Schutzwirkung durch physikalische Absorption weit zurück.

Die beobachteten starken Schutzwirkungen der Thioharnstoffvorbehandlungen sind allerdings auch durch die Absorption seitens der in der imbibierten Membran vorhandenen, bzw. eventuell ins Protoplasma eingedrungenen Thioharnstoffmengen noch nicht ganz befriedigend zu erklären, da dabei Stoffmengen angenommen werden müssen, die einer 5 bis 10 μ dicken Schichte entsprechen. Solche Schichtdicken werden aber kaum erreicht werden. Man wird daher zusätzlich auch an eine Anreicherung des Thioharnstoffes in der Zellwand denken müssen.

Die Dissoziationskonstante des Thioharnstoffes ist allerdings äußerst klein. Sie beträgt $1,1 \cdot 10^{-15}$ (Stauff 1956). Die Halbwertsstufe ist erst bei pH-0,96 erreicht. Bei annähernd neutraler Reaktion, wie sie die verwendeten Lösungen hatten, ist daher an sich kaum mit einer Ionisation des Thioharnstoffes zu rechnen. Es besteht aber durchaus die Möglichkeit, daß es durch die Dissoziation der in der Zellwand vorhandenen Pektinstoffe zu relativ hohen lokalen Aziditäten („Austauschazidität“) kommt, die den Thioharnstoff zur Ionisation veranlassen. Dies könnte aber dann auch zu einer elektro-

adsorptiven Anreicherung des Thioharnstoffes in der Membran und damit zu einer gesteigerten UV-Absorption der mit Thioharnstoff imbibierte Membran führen.

Zwei in Tab. 24 wiedergegebene Versuche sprechen für diese Möglichkeit: Innenepidermen der Zwiebelschuppe von *Allium cepa* wurden einerseits nur mit 0,1 mol. Thioharnstoff, andererseits mit Mischlösungen, die 0,1 mol. Thioharnstoff und 0,2 mol. CaCl_2 enthalten, 30 Minuten lang vorbehandelt und dann bestrahlt. 0,2 mol CaCl_2 für sich allein zur Vorbehandlung verwendet, hatte keine nennenswerte Schutzwirkung. Die Mischlösung setzte aber die Schutzwirkung der reinen Thioharnstofflösung merkbar herab.

Tabelle 24. *Allium cepa*, Innenepidermis: Verminderte Schutzwirkung bei Vorbehandlung mit einer Thioharnstoff- CaCl_2 -Mischlösung.

Vorbehandlung (30 min)		Bestrahlungsdauer (min)							
		1/4	1/2	3/4	1	1 1/2	2	2 1/2	3
Vers. 1	Kontrolle, H_2O	1	1	-1	±	+	+	+	+
	0,1 mol Thioharnstoff	1	1	1	1	1	±	+	+
	0,1 m Th.H. + 0,2 m CaCl_2	1	1	1	1	+	+	+	+
	0,2 mol CaCl_2	1	1	1	+	+	+	+	+
Vers. 2	Kontrolle H_2O	1	1	±	+	+	+	+	+
	0,1 mol Thioharnstoff	1	1	1	1	1	1	+	+
	0,1 m Th.H. + 0,2 m CaCl_2	1	1	1	1	±	+	+	+
	0,2 mol CaCl_2	1	1	-1	+	+	+	+	+

Diese Versuche lassen sich folgendermaßen interpretieren: Die elektro-adsorptive Bindung von Thioharnstoffionen wird durch den CaCl_2 -Zusatz unterbunden, da die doppelt geladenen Ionen des Ca^{++} andere Kationen aus ihren elektroadsorptiven Bindungen an saure Membransubstanzen verdrängen (Höfler und Stiegler 1947, Kinzel 1953). In diesen Fällen kann also nur mehr die Imbibition der Zellwand mit Thioharnstoff, nicht aber eine Anreicherung desselben in der Zellulosewand für seinen durch die UV-Absorption gegebenen Schutzeffekt verantwortlich gemacht werden. Dementsprechend ist auch der Schutzeffekt geringer. Es sei allerdings nicht verschwiegen, daß in einigen anderen Versuchen kein Unterschied im Ausmaß der Schutzwirkung zwischen Vorbehandlung mit reinem Thioharnstoff und mit Thioharnstoff- CaCl_2 -Mischlösung zu beobachten war.

Besprechung der Versuche

Die den Strahlenschutzversuchen vorangegangene Untersuchung der Wirkung des Thioharnstoffes auf das Protoplasma unbestrahlter Zellen bestätigte seine Schädlichkeit in hypertonischen Konzentrationen (Höfler 1939), zeigte aber andererseits, daß hypotonische Lösungen bis zu 0,3 mol und darüber durch 48 Stunden schadlos ertragen werden.

Um sicher im unschädlichen Bereich zu bleiben, wurde für die Mehrzahl

der Strahlenschutzversuche eine Konzentration von 0,1 mol Thioharnstoff gewählt. Es zeigte sich dann allerdings, daß bei den für einen Strahlenschutz ausreichenden kurzen Vorbehandlungszeiten (meist 30 Minuten) auch noch höhere Konzentrationen ohne Nachteil für die Zelle verwendet werden können. Im Resistenzversuch konnte festgestellt werden, daß eine halbstündige Einwirkung einer 0,5 oder sogar 0,7 mol Thioharnstofflösung, bei nachfolgender Übertragung in Wasser, in den Zellen der Zwiebel-Innenepidermis auch nach mehreren Tagen noch keine sichtbaren Schädigungen zur Folge hat. Zudem ließ in den Bestrahlungsversuchen der tagelang vollkommen frische und gesunde Lebenszustand der durch ein Schott-WG₃-Filter während der Bestrahlung abgedeckten Kontrollhälfte jedes einzelnen Schnittes die völlige Unschädlichkeit der zu den Schutzversuchen verwendeten Thioharnstoffkonzentrationen erkennen.

Die Bestimmung der Thioharnstoffpermeabilität machte gewisse Schwierigkeiten. Die normale plasmometrische Permeabilitätsbestimmung durch Messung der Rückdehnung eines in hypertonischer Thioharnstofflösung plasmolysierten Protoplasten ist wegen der Schädlichkeit des Thioharnstoffes in dieser Konzentration nicht möglich. Aber auch die Partialmethode, bei der zu einer plasmolyseerregenden, nicht permeierenden Zuckerkonzentration noch eine unschädliche Menge des Thioharnstoffes zugefügt und deren Permeation gemessen wurde, ergab für die Zwiebel-Innenepidermis keine zufriedenstellenden Werte. Der Thioharnstoff scheint am Tonoplasten einen bedeutenden Permeationswiderstand zu finden bzw. die Vakuolenhülle so zu verändern, daß die Permeabilität für Thioharnstoff stark herabgesetzt wird.

Dieser geringen meßbaren Permeabilität des Thioharnstoffes durch die Zellsaftvakuolen der Zwiebel-Innenepidermiszellen steht die Tatsache gegenüber, daß schon eine nur wenige Minuten andauernde Vorbehandlung der Zwiebel-Innenepidermis mit 0,1 mol Thioharnstoff, ja sogar nur das Auflegen der Schnitte auf mit 0,1 mol Thioharnstoff getränktes Filterpapier während der Bestrahlung bei sofortiger Rückübertragung der Schnitte nach der Bestrahlung in Leitungswasser, schon einen deutlichen Strahlenschutz bedingt.

Das besagt aber, daß der Thioharnstoff entweder schon durch die Imbibition der Zellwand oder vielleicht auch durch rasches Eindringen durch die äußere Plasmagrenzschicht (Plasmalemma) im Binnenplasma wirksam wird, während er an der inneren Grenzschicht zur Vakuole (Tonoplast) den starken Permeationswiderstand findet. Dies kann aber andererseits zur Folge haben, daß der im Verlauf längerer Vorbehandlung in die Vakuole eingedrungene Thioharnstoff bei kurzem Auswaschen der Schnitte nicht so schnell in das Binnenplasma oder bis in die Zellwand zurücktreten kann. Kurzes Wässern der vorbehandelten Schnitte vermag daher den Thioharnstoff aus der Zellwand und — sofern eingedrungen — auch aus dem Binnenplasma fast völlig zu entfernen, so daß bei anschließender Bestrahlung die Schutzwirkung ausbleibt.

Dieser rapide Eintritt des Thioharnstoffes in die Zellwand und vielleicht auch in das Protoplasma ermöglicht aufs beste den Nachweis, daß tatsächlich nur der zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der Zelle vorhandene Thioharn-

stoff eine Schutzwirkung ausübt. Nach der Seite vor der Bestrahlung ist die Abgrenzung durch die Möglichkeit des Auswaschens des im Plasma befindlichen Thioharnstoffes gegeben. Die Wirkung des Thioharnstoffes während der Bestrahlung ist durch den Schutz erwiesen, den Schnitte erfahren, die nur während der Bestrahlung auf thioharnstoffgetränktes Filterpapier aufgelegt waren und daß eine Nachbehandlung wirkungslos ist, zeigen Versuche, in denen die Schnitte ohne Vorbehandlung auf wassergetränktem Filterpapier bestrahlt und unmittelbar darauf in eine Thioharnstofflösung gelegt wurden. Hier war keine oder nur gelegentlich eine ganz schwache, nicht regelmäßig zu reproduzierende Schutzwirkung zu erkennen.

Man wird daraus schließen dürfen, daß der Thioharnstoff weder im Verlauf der Vorbehandlung irgendwelche, die schädigende UV-Strahlenwirkung auf das Protoplasma vermindernde festere Bindung mit strahlenempfindlichen Plasmakomponenten eingeht, noch daß er nach der Bestrahlung in nekrobiotische Abläufe schützend eingreift, sondern daß er nur im Augenblick der Bestrahlung seine Schutzwirkung ausübt.

Dieses klare Ergebnis zeigt weiters, daß der Schutzwirkung des Thioharnstoffes gegen kurzwellige UV-Bestrahlung von Pflanzenzellen jedenfalls ein wesentlich einfacherer Mechanismus zugrunde liegt als seiner Schutzwirkung in röntgenbestrahlten tierischen Organismen (vgl. Einleitung; Koch 1958).

Die beim tautomeren Thioharnstoff mögliche SH-Gruppe, die bei verschiedenen Sulfhydrylkörpern als wesentlich für ihre Schutzwirkung angesehen wird, kann beim Thioharnstoff keine Rolle spielen, da mit Sicherheit angenommen wird, daß sie im physiologischen pH-Bereich nicht frei ist. Koch (1958) betont nachdrücklich, daß offenbar ganz entscheidende Unterschiede zwischen den Sulfhydrylverbindungen der Cystein-Cysteamin-Gruppe und dem Thioharnstoff bestehen müssen und beide keineswegs gleichsinnig als „OH-Radikalfänger“ angesehen werden können. Als einen wesentlichen Unterschied findet Koch, daß der Thioharnstoff im Gegensatz zum Cysteamin-Cystamin (Eldjarn und Pihl 1956) keine festen Bindungen mit Proteinen eingeht. Mit S^{35} -Thioharnstoff durchgeführte Dialyseversuche zeigten, daß der Thioharnstoff schnell aus Proteinlösungen (z. B. Rinderserum) herausdialysiert.

Transmissionsmessungen mit einem Beckmann-Spektralphotometer zeigten, daß Thioharnstoff kurzwellige UV-Strahlen sehr stark absorbiert (siehe Abb. 12). Werden Quarzküvetten mit Thioharnstoff in Konzentrationen gefüllt, die 0,1, 0,2 und 0,5 mol Thioharnstoff in 5 bzw. 10 μ dicken Schichten entsprechen, und diese als Filter über unvorbehandelte Zwiebelinnenepidermen von *Allium cepa* gelegt, so erfahren diese einen ähnlichen Schutz wie nach 30 Minuten Vorbehandlung mit den gleichen Konzentrationen (siehe Tab. 23). Wir dürfen daraus schließen, daß zumindest der Hauptteil der Schutzwirkung des Thioharnstoffes gegen UV-Bestrahlung durch die Absorption dieser Strahlen in der mit Thioharnstoff imbibierten Zellwand, bzw. in dem in den Protoplasten eingetretenen Thioharnstoff zustande kommt.

Die Beobachtung, daß 0,1 mol (berechnet auf 10 μ Schichtdicke) Thioharn-

stoff im Küvettenversuch besser schützt als eine 2%ige Essigsäure (1 cm Schichtdicke) und die Tatsache, daß der Thioharnstoff in dieser Verdünnung im Wellenbereich unterhalb $230\text{ m}\mu$, der von der Essigsäure absorbiert wird, noch ein zweites kleineres Transmissionsmaximum besitzt (siehe Abb. 12), sprechen dafür, daß auch dieser kurzwellige UV-Strahlenbereich eine wesentlich schädigende Wirkung auf die Zelle ausübt. Da in diesem kurzwelligen Bereich aber radiochemische Zerlegungen mit Bildung von Ionen, Radikalen und Peroxyden in erhöhtem Maße zu erwarten sind, erscheint die Möglichkeit für eine teilweise Schutzwirkung entsprechender Stoffe jedenfalls gegeben. Ob bei Thioharnstoff neben seiner starken Schutzwirkung infolge „konkurrierender Absorption“ auch noch ein gewisser chemischer Strahlenschutz vorliegt, konnte nicht mit Sicherheit entschieden werden.

In vergleichenden Versuchen, in denen Zwiebelinnenepidermen einerseits mit Thioharnstoff und andererseits mit einer Thioharnstoff- CaCl_2 -Mischlösung behandelt wurden, erfuhren in einigen Fällen die mit reinem Thioharnstoff vorbehandelten Schnitte eindeutig einen besseren Schutz. Es wird dies als ein Anzeichen dafür gesehen, daß der Thioharnstoff doch auch bis zu einem gewissen Grad in der Zellwand angereichert werden kann, was im Falle der Mischlösungen nicht möglich ist, da dort die Thioharnstoffionen durch die doppelt geladenen Ionen des Ca^{++} aus ihren elektroadsorptiven Bindungen in der Zellwand verdrängt werden.

Die Dauer der Vorbehandlung hat bei gleicher Konzentration (z. B. 0,1 mol Thioharnstoff) keinen wesentlichen Einfluß auf die Schutzwirkung. Diese ist nach 12 Stunden Vorbehandlung kaum anders als nach 30 Minuten Vorbehandlung. Der zwar nur langsam in die Zellsaftvakuole permeierende, hingegen überaus schnell in die Zellwand und vielleicht auch durch die äußere Plasmagrenzschicht ins Binnenplasma eindringende Thioharnstoff stellt sich anscheinend rasch mit der Außenkonzentration ins Gleichgewicht. Es kommt im Protoplasma sichtlich zu keinerlei Speicherung bzw. festeren Bindung.

Um so deutlicher ist dem gegenüber die Abhängigkeit der Schutzwirkung von der Konzentration der verwendeten Thioharnstofflösung. Tab. 15 zeigt, daß bei 30 Minuten Vorbehandlungsdauer Konzentrationen von 0,001 bis 0,01 mol noch wirkungslos sind, daß bei 0,05 mol bereits eine deutliche Schutzwirkung auftritt und daß diese bei Verwendung steigender Konzentrationen anfangs sehr stark und gegen die höchsten Konzentrationen (0,5 mol) immer schwächer zunimmt (Tab. 14). Diese zunehmende Schutzwirkung erklärt sich zwanglos durch die Annahme, daß es auch hier jeweils zu einem Konzentrationsausgleich zwischen Außenlösung und Thioharnstoff in der Zelle kommt, wobei der höhere Thioharnstoffgehalt infolge stärkerer UV-Absorption, eine bessere Schutzwirkung auszuüben vermag.

Prinzipielles Interesse verdienen schließlich die Versuche über die Wirkung des Thioharnstoffes auf plasmatische Veränderungen nach subletaler UV-Bestrahlung. Im Abschnitt I wird darauf hingewiesen, daß subletale UV-Bestrahlungen in einer Dauer von 15 bis 30 Sekunden bei der Zwiebelinnenepidermis und in einer Dauer

von 3 bis 4 Minuten bei der Außenepidermis bereits sehr deutliche Permeabilitätsänderungen in den bestrahlten Zellen zur Folge haben. Bei Innenepidermen der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* ist besonders auffällig die sich in einem schnelleren Plasmolyseeintritt äußernde Erhöhung der Wasserpermeabilität und die bei Dauerwässerung nach Bestrahlung festzustellende Exosmose von Zellsaftstoffen. Bei den Außenepidermen ist die Hemmung der Glyzerinpermeabilität eine regelmäßig auftretende, durch viele Tage zu beobachtende Folge einer subletalen Bestrahlung.

Trotzdem nun die Todesgrenze durch die Thioharnstoffbehandlung gegenüber den unbehandelten Kontrollen auf die drei- bis vierfache Bestrahlungsdauer und höher hinaufgerückt werden kann, werden die genannten Permeabilitätsänderungen durch den Thioharnstoff überhaupt nicht beeinflusst. Sie treten in den durch Thioharnstoff bestgeschützten Versuchsserien nach gleich kurzen Bestrahlungszeiten auf, wie bei den nicht behandelten Kontrollen. Man wird annehmen dürfen, daß es sich hier um eine völlig andere Strahlenwirkung handelt als bei jener, die zum Zelltod führt.

Da die Auswirkungen der Bestrahlung auf die Permeabilitätsverhältnisse des Protoplasmas durch die konkurrierende Absorption des Thioharnstoffes nicht beeinflusst werden, ist es offensichtlich, daß diese durch längerwellige UV-Bereiche ausgelöst werden, als sie der Thioharnstoff zu absorbieren vermag. Die tödlich schädigenden Wirkungen nehmen hingegen gegen den kurzwelligen Bereich des UV-Spektrums immer mehr zu.

Gleiches gilt auch für die cytomorphologischen Veränderungen der Chondriosomen und der im Normalzustand meist amöboiden Leukoplasten. Beide runden sich auch bei den bestgeschützten Zwiebelinnenepidermen nach gleich kurzen Bestrahlungszeiten, wie in den nicht vorbehandelten, ungeschützten Kontrollschnitten (siehe Tab. 22).

Die Plasmaströmung hingegen erfährt durch die Thioharnstoffvorbehandlung auch einen gewissen Schutz und bleibt ein Stück in den geschützten Bereich hinauf erhalten.

Zusammenfassung

1. Gegenstand vorliegender Untersuchung ist die Frage, ob und unter welchen Umständen an Pflanzenzellen (Epidermen von Zwiebelschuppen von *Allium cepa* und von Blattunterseiten des Rotkohl und von *Rhoeo discolor*) durch Thioharnstoff ein Schutz gegen die schädigende Wirkung kurzwelliger ultravioletter Strahlen ($< 310 \text{ m}\mu$) erzielt werden kann.

2. Der Hauptfrage nach der Schutzwirkung des Thioharnstoffes gegen UV-Bestrahlung wurde eine Untersuchung der Wirkung der UV-Strahlen auf die unbehandelten Zellen und eine Prüfung der Wirkung des Thioharnstoffes auf die unbestrahlten Zellen vorangestellt.

3. Als Strahlenquelle diente eine Quarzanalysenlampe mit geradem Hochdruckbrenner (AS 300) der Firma Astralux (Wien) bei normaler Netzspannung von 220 Volt. Bei der Bestrahlung wurde jeder Schnitt zur Hälfte mit einem Schott-WG₅-Filter abgedeckt, das nur Strahlen länger als $310 \text{ m}\mu$ durchläßt. Da unter dem Filter niemals Strahlenschädigungen

auftraten, können die in der vollbestrahlten Hälfte beobachteten Wirkungen den Strahlen kürzer als 310 m μ zugeschrieben werden.

4. Die Bestrahlungsversuche an den nicht vorbehandelten Epidermen ergaben charakteristische Resistenzgrenzen, die weitgehend von der Dicke der gegen die Strahlenquelle gerichteten äußeren Zellwand abhängig zu sein scheinen. Die zur Tötung der Zellen nötigen Bestrahlungszeiten ändern sich stark mit der Entfernung des Objekts von der Strahlenquelle. Es wurde daher in allen Versuchen ein gleichmäßiger Abstand von 25 cm eingehalten. Der Lebenszustand der Zellen wurde im allgemeinen 24 Stunden nach der Bestrahlung geprüft. Die Todesbilder der Zellen sind für den UV-Strahlentod nicht besonders kennzeichnend. Charakteristisch sind hingegen die plasmatischen Veränderungen in den absterbenden sowie in den mit subletalen Dosen bestrahlten Zellen.

5. Die Thioharnstoffresistenz der unbestrahlten Zellen reicht bei 48 Stunden Einwirkung bis knapp an den hypertonischen Bereich heran (0,4 bis 0,5 mol bei der Innenepidermis der Zwiebelschuppen und beim Rotkohl). Hypertonische Konzentrationen wirken stark schädigend. Gegen die Letalkonzentration zu treten Systrophien auf, wird die Plasmaströmung verlangsamt und treten Viskositätsänderungen im Protoplasma ein. Die in Wasser länglichen Chondriosomen und amöboiden Leukoplasten runden sich bei 48stündiger Einwirkung schon in 0,05 mol Thioharnstoff. Bei kürzerer Einwirkungsdauer (30 Minuten) und nachfolgender Übertragung in Wasser haben allerdings auch noch Konzentrationen von 0,5 bis 0,7 mol innerhalb mehrerer Tage keine nachteiligen Folgen. Die für die Schutzversuche verwendeten Konzentrationen und Einwirkungszeiten des Thioharnstoffes lagen daher durchwegs noch weit im subletalen Bereich.

6. Die Permeabilität des Thioharnstoffes läßt sich mit normaler plasmametrischer Methode wegen der Schädlichkeit hypertonischer Konzentrationen an der Zwiebel-Innenepidermis nicht messen. Die mit Zucker kombinierte Partialmethode ergibt aber bei der Zwiebelinnenepidermis gleichfalls auffallend niedrigere Werte, die auf einen bedeutenden, wahrscheinlich erst durch die Thioharnstoffeinwirkung selbst verursachten Permeationswiderstand zurückzuführen ist.

7. Die schon nach kürzester Einwirkungszeit nachweisbare Strahlenschutzwirkung des Thioharnstoffes zwingt zur Annahme, daß der langsamen Permeabilität des Thioharnstoffes bis in die Vakuolen eine sehr rasche Imbibition der Zellwände und vielleicht auch eine sehr rasche Intrabilität durch die äußere Plasmagrenzschicht bis in das Binnenplasma gegenüber steht. Der Permeationswiderstand ist wahrscheinlich erst an der Grenzschicht zur Vakuole (Tonoplast) gegeben.

8. An allen drei Versuchsobjekten war durch Thioharnstoffvorbehandlung ein klarer Schutz gegen die schädliche Wirkung der kurzwelligen UV-Strahlen zu erreichen. Die Dauer der letalen Bestrahlungszeit ließ sich dadurch um das Zwei- bis Vierfache, unter Umständen sogar noch viel weiter erhöhen.

9. Die Mehrzahl der Schutzversuche wurde mit 0,1 mol Thioharnstoff an Zellen der Innenepidermis der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* ausge-

führt. Streng vergleichbar sind immer nur Versuchsreihen mit Epidermen einer und derselben Zwiebel, da verschiedene Zwiebeln oft recht verschiedene Grade der Schützbarkeit zeigen.

10. Die Fähigkeit des Thioharnstoffes, fast augenblicklich in die Zellwand und vielleicht auch in das Plasma der Zwiebel-Innenepidermiszellen eindringen zu können, erlaubt die eindeutige Feststellung, daß der Thioharnstoff seine schützende Wirkung nur ausüben kann, wenn er im Augenblick der Bestrahlung in der Zelle vorhanden ist. Er wirkt schon nach kürzesten Vorbehandlungszeiten (5 Minuten), ja sogar, wenn die Schnitte nur während der Bestrahlung auf einem mit Thioharnstoff getränktem Filterpapier aufgelegt sind, während keine oder fast keine Schutzwirkung zu erzielen ist, wenn die unbehandelten, auf Wasser bestrahlten Schnitte erst unmittelbar nach der Bestrahlung in Thioharnstoff eingebracht werden.

11. Daß der Thioharnstoff keine festeren Bindungen mit irgendwelchen Zellwand- oder Plasmakomponenten eingeht geht daraus hervor, daß er auch nach längerer Vorbehandlung schon durch kurze Wässerung (5 Minuten) wieder ausgewaschen werden kann. Wird anschließend bestrahlt, so tritt keine Schutzwirkung mehr auf.

In die gleiche Richtung weist die Tatsache, daß bei gleicher Konzentration des Thioharnstoffes (z. B. 0,1 mol) die Dauer der Vorbehandlung von dem Zeitpunkt an, zu dem der Konzentrationsausgleich zwischen Thioharnstoffgehalt in der Zellwand bzw. im Protoplasma und in der Außenlösung erreicht ist, keine Rolle spielt. So besteht z. B. bei Verwendung von 0,1 mol Thioharnstoff kaum ein Unterschied zwischen einer Vorbehandlung von 30 Minuten und einer solchen von 12 Stunden.

12. Andererseits ist aber das Ausmaß der Schutzwirkung sehr von der Konzentration des Thioharnstoffes abhängig. Bei einer Vorbehandlung von 30 Minuten Dauer zeigen sich die Konzentrationen von 0,001 bis 0,01 mol als wirkungslos, bei 0,05 mol ist bereits eine deutliche Schutzwirkung zu erkennen, die dann bis zu 0,5 mol erst rasch und dann immer langsamer zunimmt.

13. Der sich in der Erhöhung der Strahlenresistenz ausdrückende Schutz durch Thioharnstoff erstreckt sich auch bis zu einem gewissen Grad auf die Plasmaströmung. Sie bleibt in den vorbehandelten Schnitten stets bis zu etwas längeren Bestrahlungszeiten erhalten als in den nicht vorbehandelten.

14. Die nach subletaler Bestrahlung an nicht vorbehandelten Zwiebel-Innenepidermiszellen besonders deutlich zu beobachtende Erhöhung der Wasserpermeabilität und bei Dauerwässerung nach der Bestrahlung eintretende Exosmose von Zellsaftstoffen sowie die Hemmung der Glycerinpermeabilität in den Außenepidermen der Zwiebelschuppen wird durch die Thioharnstoff-Vorbehandlung hingegen nicht beeinflusst.

Trotz Verlängerung der letalen Bestrahlungsdauer auf das Drei- bis Vierfache treten die erwähnten Permeabilitätsänderungen auch bei den mit Thioharnstoff vorbehandelten Schnitten nach gleich kurzen Bestrahlungszeiten auf wie bei den nicht vorbehandelten Kontrollen. Auch die Abrundung der Chondriosomen und Leukoplasten erfolgt nach gleich kurzen Bestrahlungszeiten wie bei den unbehandelten Kontrollen.

Dies führt zu der Annahme, daß es sich hier um eine völlig anders geartete Strahlenwirkung handelt als bei jener, die zum Zelltod führt.

15. Versuche, in denen Quarzküvetten mit verschiedenen konzentrierten Thioharnstofflösungen als Filter benützt wurden, zeigen, ebenso wie Transmissionsmessungen mit einem Beckmann-Spektrophotometer, daß dem Thioharnstoff ein sehr großes UV-Absorptionsvermögen zukommt.

16. Ein Vergleich des Strahlenschutzes unter Thioharnstoffküvetten und nach Vorbehandlung der Schnitte mit Thioharnstoff läßt schließen, daß zumindest die wesentliche Schutzwirkung des Thioharnstoffes in der Zelle auf dessen starker UV-Absorption beruht.

17. Da auch eine mit 2%iger Essigsäure gefüllte, 1 cm hohe Quarzküvette den darunter liegenden Schnitt noch beträchtlich gegen die Wirkung der UV-Strahlung zu schützen vermag, erscheint erwiesen, daß die verwendete UV-Strahlenquelle noch reichlich Strahlen kürzer als $230\text{ m}\mu$ aussendet und daß diese eine stark schädigende Wirkung auf das Protoplasma ausüben.

18. In diesem kurzwelligen UV-Bereich unter $230\text{ m}\mu$ besteht die große Wahrscheinlichkeit, daß es auch zu gesteigerten strahlenchemischen Zerlegungen mit Bildung von Ionen, Radikalen und Peroxyden kommt, an denen auch ein chemischer Strahlenschutz einsetzen könnte. Wie weit dieser beim Schutz durch Thioharnstoff eine Rolle spielt, muß bei dem starken UV-Absorptionsvermögen dieser Substanz offen bleiben.

19. Die Versuche werden mit anderen Substanzen fortgesetzt.

Literatur

- Alexandrov, W. J., 1960: Über die mikroskopische Struktur der Kerne von Epidermiszellen der Zwiebelsschuppen von *Allium cepa* L. Cytologia 2, 289—393. Verl. Akad. d. Wiss. d. UdSSR., Moskau (russisch).
- Bacq, Z. M., und P. Alexander, 1958: Grundlagen der Strahlenbiologie. G. Thieme, Stuttgart. 396 S.
- und A. Herve, 1951: Arch. Int. Physiol. 59, 348.
- Biebl, R., 1942 a: Wirkung der UV-Strahlung auf *Allium*-Zellen. Protoplasma 36, 491—513.
- 1942 b: Wirkung der UV-Strahlen auf die Plasmapermeabilität. Protoplasma 37, 1—24.
- 1943: Beobachtungen über UV-Strahlenresistenz anthokyanhaltiger Zwiebelepidermiszellen. Protoplasma 37, 566—568.
- 1947: Die Resistenz gegen Zink, Bor und Mangan als Mittel zur Kennzeichnung verschiedener pflanzlicher Plasmasorten. S.B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 155, 145—157.
- 1956: Morphologische, anatomische und zellphysiologische Untersuchungen an Pflanzen vom „Gamma-Feld“ des Brookhaven National Laboratory (U. S. A.). Österr. bot. Z. 103, 400—435.
- 1958: Radiomorphosen an *Soja hispida*. Flora 146, 68—93.
- 1959 a: Strahlenempfindliche Keimungsphase und Dauerbestrahlung. Österr. bot. Z. 106, 104—123.
- 1959 b: The radiosensitive phase in plant germination. Proc. Int. Conf. Peaceful Uses of Atomic Energy, Geneva 1958, 27 (Agriculture), 299—304.

- Biebl, R., 1960 a: Die Pflanzenzelle als Objekt zur Prüfung chemischer Strahlenschutzstoffe. Anz. Österr. Akad. Wiss.
- 1960 b: Röntgenstrahlenwirkungen auf Commelinaceen-Stecklinge. S.B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 168, 883—916.
- und R. Pape, 1951: Röntgenstrahlenwirkungen auf keimenden Weizen. Österr. bot. Z. 98, 361—382.
- und W. Rossi-Pillhofer, 1954: Die Änderung der chemischen Resistenz pflanzlicher Plasmen mit dem Entwicklungszustand. Protoplasma 44, 113—135.
- und W. Url, 1958: UV-Strahlenwirkungen auf Zellen von *Allium cepa*, besonders deren Chondriosomen und Plastiden. Protoplasma 49, 329—352.
- Bärlund, H., 1929: Permeabilitätsstudien an Epidermiszellen von *Rhoeo discolor*. Acta Bot. Fenn. 5, 1—117.
- Berger, H., F. L. Haas, O. Wyss, and W. Stone, 1953: Effect of sodium azide on radiation damage and photoreactivation. J. Bacter. 65, 538—543.
- Calcutt, G., 1950: A factor influencing the intracellular exposure of sulphhydryl groups. Nature 166, 443—444.
- Cole, L. J., M. C. Fishler, and V. P. Bond, 1953: Subcellular fractionation of mouse splin radiation protection activity. Proc. Nat. Acad. Sci. 39, 759—772.
- Collander, R., 1954: The Permeability of *Nitella* Cells to Non Electrolytes. Physiol. Plantarum 7, 420—445.
- und H. Bärlund, 1955: Permeabilitätsstudien an *Chara ceratophylla* II. Acta Bot. Fenn. 11.
- und B. Wikström, 1949: Die Permeabilität pflanzlicher Protoplasten für Harnstoff und Alkylharnstoff. Physiol. Plantarum 2, 235.
- Dale, W. M., 1952: Indirect action of ionizing radiations and aqueous solutions and its dependence on the chemical structure of the substrate. J. Cell. Comp. Physiol. 39, 39—55.
- Eldjarn, L., and A. Pihl, 1956: On the mechanism of chemical protection against ionizing radiation. Progr. in Radiobiology 249—259.
- Forssberg, A., and N. Nybom, 1953: Combined effects of cysteine and irradiation on growth and cytology of *Allium cepa* roots. Physiol. Plant. 6, 78—95.
- Fritz-Niggli, H., 1957: Strahlenschäden und Schutzmaßnahmen bei der medizinischen Anwendung der Radio-Isotope. Strahlentherapie 102, 355—369.
- 1959: Strahlenbiologie. Thieme, Stuttgart.
- Germ, H., 1938: Erfahrungen und Untersuchungen bei der Kühllagerung von Speisezwiebeln. Gartenztg. Österr. Gartenbauges., H. 11, 129.
- Giese, A. C., R. M. Iverson, R. T. Sanders, and J. P. Bors, 1955: Peroxyde and Ultraviolet Radiation Effects. Exper. Cell Res. 8, 369—386.
- Gordon, S. A., 1957: The effects of ionizing radiation on plants: Biochemical and physiological aspects. In: The Quarterly Rev. of Biology 32, 3—14.
- Glubrecht, H., 1955: Über die Wirkung von UV-Strahlen in somatischen Zellen. Z. f. Naturf. 8 b, 17—27.
- Haley, Th. J., S. Mann, and A. H. Dowdy, 1951: Inability of thiourea to modify roentgenray irradiation mortality in rats. Science 114, 153—154.
- Heinmets, F., W. W. Taylor, and J. J. Lehman, 1954: The use of metabolites in the restoration of the vitality of heat and chemically inactivated *Escherichia coli*. J. Bacter. 67, 5—12.
- Hofmeister, L., 1955: Vergleichende Untersuchungen über spezifische Permeabilitätsreihen. Bibliotheca Botan. 113, 1—85.

- Hofmeister, L., 1948: Über die Permeabilitätsbestimmung nach der Deplasmolysezeit. S.B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 157, 55—82.
- Höfler, K., 1918: Permeabilitätsbestimmung nach der plasmometrischen Methode. Ber. dtsch. bot. Ges. 36, 414—422.
- 1928: Über Kappenplasmolyse. Ber. dtsch. Bot. Ges. 46, (73)—(82).
- 1932: Plasmolyseformen bei *Chaetomorpha* und *Cladophora*. Protoplasma 16, 189.
- 1934a: Kappenplasmolyse und Salzpermeabilität. Z. wiss. Mikrosk. 51, 70—87.
- 1934b: Permeabilitätsstudien an Stengelzellen von *Majanthemum bifolium*. S.B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 213—264.
- 1939: Nekrose in Sulfoharnstoff. Flora, N. F. 33, 151—142.
- und A. Stiegler, 1947: Cresylechtviolett als Vitalfarbstoff. Mikroskopie 2, 250—258.
- Hollaender, A. and G. E. Stapleton, 1953: Fundamental aspects of radiation protection from a microbiological point of view. Physiol. Rev. 33, 77—84.
- 1956: The influence of chemical pre- and posttreatments on radiosensitivity of Bacteria, and their significance for higher organism. In: Ciba Foundation Symposium on Ionizing Radiations and Cell Metabolism, London, 120—135.
- C. C. Congdon, D. G. Doherty, T. Makinodan, and A. C. Upton, 1959: New Developments in Radiation Protection and Recovery. Proc. Int. Conf. Peaceful Uses of Atom. Ener., Geneva 1958, 23 (Experience in Radiation Protection) 3—9.
- Hölzl, J. und E. Bancher, 1939: UV-Aufnahmen der Außenepidermis der Zwiebelschuppe von *Allium cepa* mit Hilfe der Fluoreszenzeinrichtung Lux UV von Reichert, Wien. Mikroskopie 14, 153—157.
- Houska, H., 1939: Zur protoplasmatischen Anatomie der Küchenzwiebel. Österr. bot. Z. 88, 161—186.
- Jost, L., 1929: Einige physikalische Eigenschaften des Protoplasmas von *Valonia* und *Chara*. Protoplasma 7, 1—22.
- Kinzel, H., 1933: Untersuchungen über die Chemie und Physikochemie der Gallertbildungen von Süßwasseralgen. Österr. bot. Z. 100, 25—79.
- Klingmüller, W., 1959: Zur Möglichkeit eines nachträglichen Strahlenschutzes bei Samen von *Vicia faba*. Z. Naturforsch. 14b, 268—272.
- und Mahesch C. Saxena, 1959: Nachweis freier Radikale in röntgenbestrahlten Samen von *Vicia faba* mittels Elektrosin-Rezonanz-Absorption. Die Naturwissenschaften 46, 475—476.
- Kluyver, A. J., 1911: Beobachtungen über die Einwirkung von ultravioletten Strahlen auf die höhere Pflanze. S.B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl. 120, Abt. I, 1137.
- Koch, R., 1958: Untersuchungen über einen biologischen Strahlenschutz. XXV. Mitteilung: Die Beziehung des Thioharnstoffes zu Proteinen und zur Gruppe schwefelhaltiger Strahlenschutzstoffe. Strahlentherapie 107, 419—425.
- 1955: Zur Genese des durch Thioharnstoff und seine Derivate ausgelösten Lungenödems (Pneumose). Arch. exper. Path. Pharmacol. 227, 239—245.
- Kolmark, G., 1958: Patterns of Interaction between X-Rays and Chemicals as Studied by Reverse-Mutation Rates in *Neurospora*. Abstr. Intern. Congr. Radiation Research, Burlington, Vermont, Aug. 10—16, 1958.

- Krahe, M., H. A. Künkel und H. J. Schmermund, 1957: Über die Beeinflussbarkeit der biologischen Strahlenwirkung durch Applikation von Schutzstoffen nach der Bestrahlung. *Strahlentherapie* 102, 288—290.
- Künkel, H. A., and G. Schubert, 1959: Effects of Protective Agents applied after Irradiation. *Progr. Nucl. Energy, Ser. 6, Biol. Sciences*, 2, 217—244.
- Kusin, A. M., 1957: Die biochemischen Grundlagen der biologischen Wirkung ionisierender Strahlen. *Sowjetwiss. Naturw. Beitr.*, H. 4, 323—376, H. 5, 432—467, H. 6, 542—563.
- Küster, E., 1933: Dellen und Löcher im Protoplasma pflanzlicher Zellen. *Protoplasma* 19, 443—451.
- Langendorff, H., 1958: Der gegenwärtige Stand der Radiobiologie. *Atomkernenergie* 3, 438—444.
- R. Koch und U. Hagen, 1954 a: Zum Wirkungsmechanismus des Thioharnstoffes beim biologischen Strahlenschutz. *Arch. int. Pharmacodyn.* 100, 1—16.
- — — 1954 b: Untersuchungen über einen biologischen Strahlenschutz. VIII. Mitteilung: Zur Spezifität des Cystein und verwandter Sulfhydrylkörper beim Strahlenschutz. *Strahlentherapie* 95, 238—250.
- — — 1955: Untersuchungen über einen biologischen Strahlenschutz. X. Mitteilung: Oxydo-reduktive Vorgänge beim Strahlenschaden und ihre Bedeutung für den Strahlenschutz. *Strahlentherapie* 97, 209—230.
- — — 1955 b: Die toxische Wirkung des Thioharnstoffes als Ursache seines Strahlenschutzeffektes. *Arch. int. Pharmacodyn.* 104, 57—60.
- Lea, D. E., 1946: Action of radiation on living cells. University Press Cambridge, 402 S.
- Livingston, R., 1935: Photochemistry. In: A. Hollaender, *Radiation Biology 2: Ultraviolet and Related Radiations*, 1—40.
- Marklund, G., 1936: Vergleichende Permeabilitätsstudien an pflanzlichen Protoplasten. *Acta Bot. Fenn.* 18, 1.
- Maurer, H.-J., 1958: Beitrag zur biologischen und biochemischen Wirkung ionisierender Strahlungen. 1. Grundzüge der Chemie ionisierender Strahlen. *Strahlentherapie* 106, 491—504.
- und A. Schreiber, 1959: Zur Frage des Schutzmechanismus der Sulfhydryl(-SH) Substanzen. *Strahlentherapie* 108, 73—83.
- Meindl, T., 1954: Weitere Beiträge zur protoplasmatischen Anatomie des *Helodea*-Blattes. *Protoplasma* 21, 362—393.
- Meisel, M., R. Galtsova, G. Medvedeva, N. Pomoschchnikova, L. Seliverstova, and M. Skalnova, 1959: The action of ionizing radiations and radiomimetic substances on the microbe cell. *Progr. in Nuclear Energy, Ser. VI, Biological Sciences* 2, 379—393.
- Mikaelsen, K., 1954: Protective properties of cysteine, sodium hyposulfite, and sodium cyanide against radiation induced chromosome aberrations. *Proc. nat. Acad. Scie., Wash.* 40, 171—178.
- 1955: The protective property of thiourea against radiation-induced chromosomes aberrations. *Exper. Cell Res.* 8, 400—403.
- Pany, J., 1957: Chemischer und biologischer Strahlenschutz. *Wien. klin. Wschr.* 69, 605—610 und 621—623.
- Resühr, B., 1935: Hydratations- und Permeabilitätsstudien an unbefruchteten *Fucus*-Eiern (*Fucus vesiculosus* L.). *Protoplasma* 24, 531—586.
- Riley, H. P., 1952: Preliminary report on the effect of certain chemicals on radiation damage to chromosomes. *Genetics* 37, 618—619.

- Rosen, D., S. Brohult, and P. Alexander, 1957: Effects of Gamma-Rays on Solutions of Human Serum Albumin. I. Sedimentation studies. Arch. Biochem. Biophys. 70, 266—276.
- Stahl, 1909: Zur Biologie des Chlorophylls. Jena.
- Strugger, S., 1935: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie. Berlin.
- A. T. Krebs, and Z. S. Gierlach, 1953: Investigations into the first effects of Roentgenrays on living protoplasma as studied with modern fluorochroms. Amer. J. Roent. Rad. Ther. a. Nucl. Med. 70, 365—375.
- Toth, A., 1949: Quantitative Untersuchungen über die Wirkung der UV-Bestrahlung auf die Plasmapermeabilität. Österr. Bot. Z. 96, 161—195.
- Seemann, F., 1950: Der Einfluß der Wärme und UV-Bestrahlung auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. Protoplasma 39, 555—566.
- Simonis, W., 1955: Physikalisch-chemische Grundlagen der biologischen Vorgänge. Fortschr. d. Bot. 14, 229—255.
- 1954: Physikalisch-chemische Grundlagen der Lebensprozesse. Fortschr. d. Bot. 15, 172—211.
- 1955: Physikalisch-chemische Grundlagen der Lebensprozesse. (Strahlenbiologie), Fortschr. d. Bot. 17, 415—482.
- 1956: Die Wirkung von Licht und Strahlung auf die Zelle. Handb. d. Pflanzenphys. 2, 655—705.
- und H. Glubrecht, 1957: Physikalische und chemische Grundlagen der Lebensprozesse. (Strahlenbiologie), Fortschr. d. Bot. 178—193.
- Stauff, J., 1956: Physikalische Chemie der Lösungen. In: Biochemisches Taschenbuch. Hsg. H. M. Rauen, 1956.
- Url, W., 1951: Permeabilitätsverteilung in den Zellen des Stengels von *Taraxacum officinale* und anderer krautiger Pflanzen. Protoplasma 40, 475—501.
- 1952: Unterschiede der Plasmapermeabilität in den Gewebeschichten krautiger Stengel. Physiol. Plant. 5, 135—144.
- 1960: Rosettensystrophe in Thioharnstoff-Zucker-Mischlösungen. Protoplasma 52, 260—275.
- Ursprung, A., und G. Blum, 1917: Über die Schädlichkeit ultravioletter Strahlen. Ber. dtsch. bot. Ges. 35, 385—402.
- Wanner, K., 1945: Über die Wirkung der Röntgenstrahlen auf das Plasma vegetativer Pflanzenzellen. Schweiz. Z. Path. Bact. 8.
- Weber, Fr., 1924: Plasmolyseform und Protoplasmaviskosität. Österr. bot. Z. 73, 261—266.
- 1925: Über die Beurteilung der Plasmaviskosität nach der Plasmolyseform. Z. wiss. Mikroskopie 42, 146.
- Wolff, S., 1954: Some aspects of the chemical protection against radiation damage to *Vicia faba* chromosomes. Genetics 59, 356—364.
- Wuhrmann-Meyer, K. u. W., 1941: Untersuchungen über die Absorption ultravioletter Strahlen durch Kutikular- und Wachsschichten von Blättern. Planta 32, 45—50.
- Zimmer, K. G., L. Ehrenberg und A. Ehrenberg, 1957: Nachweis langlebiger magnetischer Zentren in bestrahlten biologischen Medien und deren Bedeutung für die Strahlenbiologie. Strahlentherapie 103, 3—15.

The Behavior of the Petals in the Fading of the Flowers of *Tradescantia reflexa*

By

Kakuro Horie

Botanical Laboratory, Hyogo University of Agriculture, Sasayama, Japan

With 11 Textfigures

(Received May 14, 1960)

It was reported by B a n c h e r (1938) that there are two different types of petal degeneration during the course of the fading of *Iris* flowers. In the flowering of *Iris germanica* the petals, following their complete opening, become glassy and translucent from the margins owing to the infiltration of cell sap to the intercellular spaces, and then they roll up inward from the marginal to the basal part. Thus the fading petals become flaccid and finally somewhat flowing, so that they often spill violet sap when shaken. Another type of fading of *Iris* flowers is observed with such species as *Iris notha*, the petals of which neither become translucent nor cause sap infiltration. The flowers roll up like corkscrews and close with the petals kept dry.

Tradescantia reflexa is the most commonly known plant and affords very suitable material for the study of the life of ephemeral flowers. The corolla is composed of three purple petals whose appearances change strikingly during the course of the fading of the flowers. The purpose of the present study was to investigate the morphological and physiological characteristics of the petals during that period. It was also observed with *Tradescantia* flowers that the fading petals rolled up and finally became flowing, behaving somewhat like those of *Iris germanica*. Together with the petal rolling, the infiltration of cell sap, the separation of the cuticular layer from the epidermis and the spiral contraction of the vascular bundles were noticed as the features characteristic of the petal degeneration. The rolling of separated petals was considerably stimulated in high acidic solution.

Periodicity of Flowering of *Tradescantia reflexa*

The flowers of *Tradescantia reflexa* grown in pots were used throughout the experiment, which was carried out in the botanical laboratory of Hyogo

University of Agriculture at Sasayama during the months of May and June of 1958.

The observation of the periodicity of flowering of *Tradescantia* was carried out on June 22nd and 23rd. The weather was very fine on those days and the temperature was about 25° C. on those mornings (at 10 a.m.). In the afternoon of June 22nd, the buds which were due to open during the following morning could be readily distinguished, because they were standing upright prominently with elongated peduncles. In the evening the violet petals began to emerge from the calyx, but it was at dawn (between 4 and 5 a.m.) of June 23rd that the petals expanded and the flowers were in bloom. The flowers closed between 1 and 2 p.m. However, the period



Fig. 1. The behavior of petals of the fully expanded flowers exposed directly to the sun light. Petals exposed to sun light on the upper surface (left) and on the lower surface (right). The arrow shows the direction from which the light comes.

during which the flowers are in bloom is influenced by weather conditions. They would close as early as noon in the strong sunshine of a clear day and as late as 6 p.m. in cloudy and cool weather. Schumacher (1953) mentioned that variation in temperature have a marked influence on the length of the blooming period of ephemeral flowers. He observed with *Tradescantia* flowers, that they were in bloom for 108 hours when the plants were kept at a low temperature of 5° C.

Even if the plants were kept in complete darkness during the night and the following morning, opening of the flowers took place at about the normal time. The periodicity is therefore maintained overnight at least in the absence of light. Similar results have been obtained with *Turnera ulmifolia* (Ball 1933) and with *Cereus grandiflorus* (Schmucker 1928).

Ball (1933) mentioned that in the flower-buds of *Turnera ulmifolia* exposed to light during the night, the corollas, although they emerge from the calyx, are unable to expand. According to him this action of light is correlated with an inhibition of the normal hydrolysis of starch in petals. Therefore the effect of illumination on *Tradescantia* flower-buds was investigated. However the flower-buds illuminated during the night opened normally on the following morning.

The effect of light upon the behavior of the fully expanded petals was of some interest. The petals directly exposed to the sun light on their upper surface expanded concavely, and those exposed on their lower sur-

face somewhat convexly (Fig. 1). A similar result was also obtained in an experiment carried out in the laboratory in which detached flowers or separated petals were illuminated either on the upper or lower side of the petals by an electric lamp.

Withering and Closing of the Flowers

The flowers of *Tradescantia reflexa* opened to their full extent at about 10 a. m. on a normal clear day in June, when the petals expanded at nearly right angles to their own peduncles (Fig. 2 a, 2 a'). At a more advanced

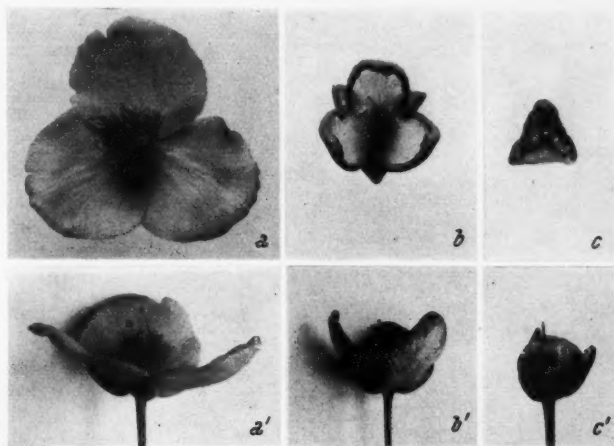


Fig. 2. The change in appearance of *Tradescantia* flowers during fading. a, a'. An expanded flower; b, b', an early fading flower, petals shrivelled and rolled up at margins. Dark colored portions indicate the sap infiltration to intercellular spaces of mesophyll; c, c', a closed flower, petals rolled up for the most part, reduced considerably in size, and having become somewhat flowing.

stage, the petals became curved concavely toward the inside, which is an indication of the initiation of senescence in flowers. This appeared normally before noon. Each petal began to rise with time, especially at the base, so that the flowers became somewhat funnel-shaped. It was about the time when the distal parts began to shrivel and became semitransparent owing to the infiltration of cell sap into the intercellular spaces (Fig. 3). The infiltration extended by degrees in a basal direction and was followed by the rolling of the petals toward the upper epidermis which commenced at the margins (Fig. 2 b, 2 b'). The infiltrated portions could easily be distinguished by their appearance of dark violet. In one to two hours the flowers fully closed, after the petals had rolled up for the most part and become considerably reduced in size. But the petals were still rising upright with their basal part (Fig. 2 c, 2 c'). These degenerated flowers were

so flowing that the violet sap fell from the petals in droplets when the plant was shaken. Finally, the withered petals were enveloped again entirely with their own calyx.

Lepeschkin (1929) came to the conclusion that the closing and the withering of ephemeral flowers are independent phenomena, and confirmed this with regard to the flowers of *Cichorium Intybus*. Ball (1933) reported that the same holds good in the case of *Turnera elegans*. In the present investigation the author confirmed also with *Tradescantia* flowers that the two phenomena are quite independent. The closing of flowers is mainly due to the rapid growth of the lower side of the petals especially in the basal part. The opening of flowers is reversely due to the more rapid

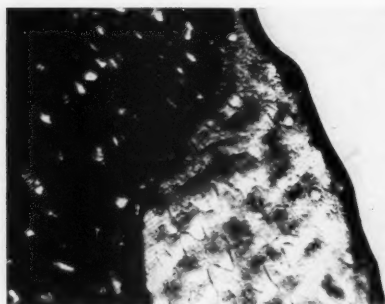


Fig. 3. A distal part of petal a portion of which has become semitransparent owing to the infiltration of intercellular spaces.

growth of the upper side of the petals in flower-buds. Such growth of petals has no direct relation with the above-mentioned degenerating pheno-

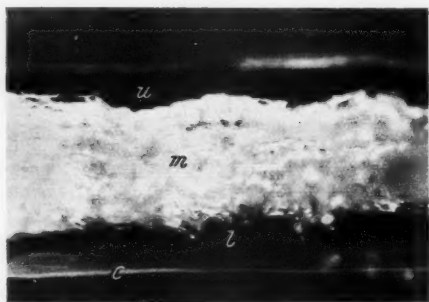


Fig. 4.

Fig. 4. Cross section of a fully expanded petal through its midrib. *u*, Upper epidermis; *m*, mesophyll; *l*, lower epidermis; *c*, cuticle. Anthocyanin is present in the epidermis. The whole of mesophyll is glittering.

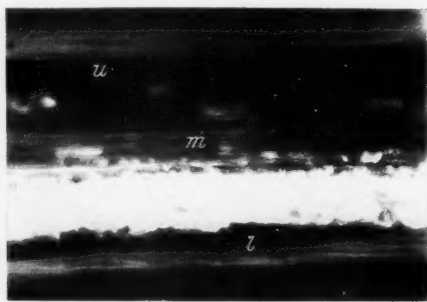


Fig. 5.

Fig. 5. Cross section of an early fading petal through its midrib. Glitter has been lost in the upper half of mesophyll.

mena, but evidently has a close relation with aerobic respiration. For, experiments were carried out to prove that not only the opening but also the closing of flowers was inhibited if they were kept in nitrogen gas, free from

oxygen. The respiratory inhibitors such as KCN, NaF, DNP, and iodoacetate also inhibited the movement of petals. The results obtained in these investigations will be reported in detail in another paper.

Infiltration of the Cell Sap and Separation of the Cuticle

Tradescantia petals are so frail and delicate that it is difficult to provide a fine slice preparation by the ordinary technique that demonstrates the anatomical structure of the fresh petal interior. So a device was adopted: a fresh petal was cut in two sections along its midrib and one part was held upright in the split of the pith of the elder, which was submerged in water aided by a metal plate so that the cross section came just below the water surface. The section thus held in water was observed under the microscope by reflected light. The epidermis, when seen in section, appeared to be darkened by the presence of anthocyanin (Fig. 4u, 4l), while the whole of the mesophyll was glittering owing to the reflection of light by the intercellular air (Fig. 4m). At the section of the petal that commenced to roll up at the margins, such glitter was lost in the upper half of the mesophyll (Fig. 5). This probably means that the infiltration happened earlier in the upper half than in the lower half. Accordingly the upper lost its turgescence, while the lower still kept turgidity. This may have some relation to the fact that petals roll up inside during the course of the fading of flowers.

One of the conspicuous characteristics of petals in the fading of ephemeral flowers is the infiltration of cell sap to intercellular spaces as mentioned above. There arises the following question. Where does the intercellular air escape when the cell sap infiltrates? In observing the early fading petal under the microscope, the intercellular air was found to contract intermittently in a basal direction, associated with the injection of infiltrated sap (Fig. 6). No trace of the disappearing air was obtained. Surely the air does not escape from the stomata as there are no stomata on both sides of the petal surface.

Concerning this, it is worthy of notice that the infiltration was preceded by separation of a very thin outer membrane from the petal epidermis. This separation as well as the infiltration took place initially at the margins and extended in a basal direction. The separation was readily detected



Fig. 6. A portion of petal where intercellular air is contracting to the basal direction. a, The portion still containing intercellular air; i, the portion infiltrated already with sap.

table even with the naked eye when the fading petals were immersed in water. More clearly could it be distinguished in the following way: a fully expanded petal was separated from the flower, placed on a glass plate, and covered with a small amount of water. In the course of time, the petal interior began to shrivel and rolled up from the margins as mentioned in the case of the fading flowers of normal plant, while its outermost fine layer long kept expanding up, independently of the remainings (Fig. 7). The cross section of a paraffin imbedded preparation demonstrating separation of the outermost layer from the surface of the epidermal cell walls is illustrated in Fig. 8.

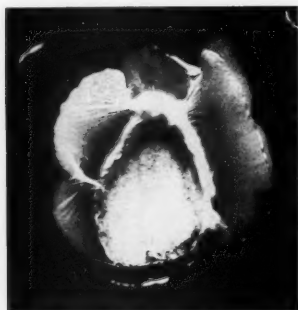


Fig. 7.

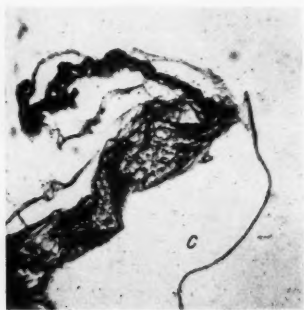


Fig. 8.

Fig. 7. Separation of cuticle from the petal epidermis. The cuticle keeps expanding up, the remaining petal shrivels and rolls up at the margins.

Fig. 8. Cross section of the rolled-up margin of petal, enlarged. c, Cuticle separated from lower epidermal cell wall.

This separated membrane was never stained purple with zinc iodine chloride, but became red brown with Sudan III. Therefore it was recognized as a cuticular layer or cuticle. Commonly in plant, the cuticle adheres closely to the surface of the epidermal cell wall from which it has originated. It separates from the epidermis with difficulty. But as exceptional cases it has been reported to lie free and loosely over the wall in some floral hairs (Eames *et al.* 1949) and the leaf of the banana (Skutsch 1927).

These degenerating behaviors of petals—the cuticle separation, the sap infiltration and the petal rolling—all take place initially at the margins and extend in a basal direction. They seem to have a close relation to each other, though the mechanism still remains obscure. The cuticle separation happens previously to the infiltration, which precedes the rolling-up of the petals. Therefore one possible explanation may be as follows: the separation of the cuticle allows intercellular air to escape through some exceedingly minute openings of the outer wall, and this is accompanied by infiltration of the intercellular spaces. The petal rolling may be caused by some relation to the infiltration.

Spiral Contraction of the Vascular Bundles and the Effect of Hydrogen Ion Concentration on the Petal Rolling

Of special interest is the spiral contraction of the vascular bundles, which was found in the rolled-up area of the withering petals (Fig. 9, 10). Such contraction is associated with the petal rolling. This occurred in the process of normal degeneration of petals, but never happened in expanded portion of petals even if they were killed, for example, by being immersed in boiling water or kept in air containing dilute vapour of chloroform. It

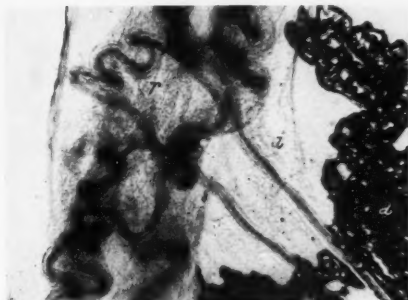


Fig. 9.



Fig. 10.

Fig. 9. A distal part of the fading petal showing spiral contraction of vascular bundles. *r*, Rolled-up portion; *i*, the portion in which the sap has infiltrated to intercellular spaces but still no rolling takes place; *a*, the portion in which intercellular air is still present. The separated cuticle was removed.

Fig. 10. Spiral contraction of vascular bundles, enlarged.

is also of interest that both the rolling and the contraction are extensible again after the petals are boiled. In the petals of the fading flowers of

Table 1. Degrees of petal rolling in different buffer solutions.

pH of phosphate buffer solution	The degrees of petal rolling	
	60 min. after beginning of immersion	240 min. after beginning of immersion
3.4	++	+++
4.8	—	++
5.6	—	+
7.9	—	—

Commelina communis and some *Iris* species, a similar bundle contraction was observed, though not so distinctly as in *Tradescantia*.

The effect of hydrogen ion concentration in medium solutions upon the

rolling of petals was investigated. The separated petals were immersed in and injected with phosphate buffer solutions ($m/100$) of different pH values by means of an evacuation pump. The degrees of petal rolling after one and four hours' immersion are shown in Table 1. The rolling was markedly pronounced in the high acidic solutions. It was never produced at pH 7.9 even after four hours, while it took place considerably after an hour at pH 3.4 (Fig. 11). It is, however, not clear if petals naturally become acidic

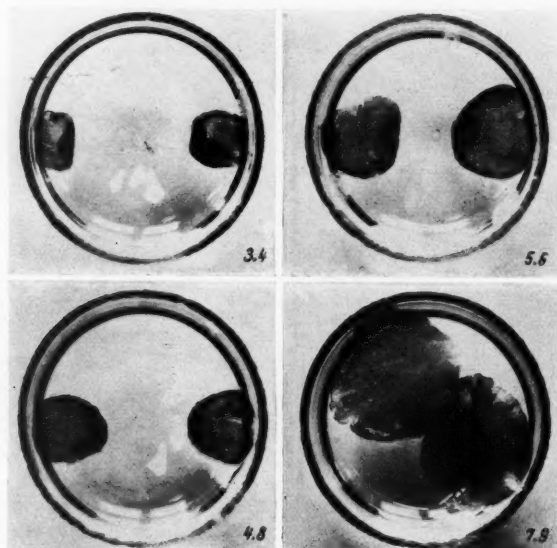


Fig. 11. Shrivelling and rolling of separated petals after immersion for 4 hours in the phosphate buffer solutions of different pH values.

as they degenerate. The withering petals did not become reddish, although anthocyanin contained in the epidermis is an indicator demonstrating cell acidity (Drawert 1954).

Permeability and Osmotic Concentration of Cells

A separated, early fading petal that began to roll up at the margins was injected with hypertonic solution of potassium nitrate ($0.5\ m$) and observed under the microscope. In the rolled-up area the epidermal cells were dead and colorless, the intercellular spaces having been already infiltrated with sap, while in the cells adjacent to this area the colored sap was still present in spite of the same infiltration of the intercellular spaces. Plasmolysis occurred in these cells, but in a few minutes rapid deplasmolysis began, during which they mostly collapsed to death and became colorless. On the contrary plasmolysis occurred normally and continued long in the cells of the basal part where neither infiltration nor rolling took

place. These observations indicate that the protoplasm permeability of cells increased as the tissues degenerated and finally they died to lose semipermeability. In consequence of this the infiltration of intercellular spaces was caused.

The petals in the buds contained a large quantity of starch in the epidermis which disappeared almost entirely after the flowers had opened. In the mesophyll cells no starch was observed either in the buds or open flowers. Therefore the rapid expansion of petals seems to be connected with the hydrolysis of the stored starch in the epidermis.

The incipient osmotic concentration of epidermal cells was presented in Table 2. It is to be noted that the values in the expanded flowers were 0.1 mol lower than those in the buds that were due to open on the following morning (expanded flower 0.27 mol; flower-bud 0.37 mol). From this fact

Table 2. Osmotic concentration of the epidermal cells of *Tradescantia* petals.

		Osmotic concentration (mol)		
		Apical part	Central part	Basal part
Opening flower	Upper	0.27	0.27	0.26
	Lower	0.27	0.27	0.26
Flower-bud	Upper	0.37	0.37	0.37
	Lower	0.37	0.37	0.37

it is assumed that the rapid water uptake and enlargement of cells during the petal expansion not only cancelled the increasing effect upon osmotic concentration due to starch hydrolysis, but rather produced a decreasing effect upon it. No significant differences were found in the osmotic concentration of epidermal cells in the portions—apical, central and basal, and also between the upper and the lower sides of petals.

Summary

1. The behavior of the petals in the fading of the ephemeral flowers of *Tradescantia reflexa* was investigated morphologically and physiologically. The flowers opened at dawn and closed in the early afternoon. During the fading, the petals were observed to shrivel, become semitransparent owing to the infiltration of the intercellular spaces and roll up from the margins.

2. Preceding the infiltration of intercellular spaces, the separation of a very thin outer membrane from the epidermal cell walls was observed, which, together with infiltration, happened at the margins and proceeded in a basal direction. This membrane was recognized as the cuticle. One possible explanation for this separation may be as follows: it allows intercellular air to escape through some exceedingly minute openings of the outer walls, and this is accompanied by infiltration of the intercellular spaces.

3. The spiral contraction of the vascular bundles was observed in the rolled-up area of the withering petals. It occurred in the process of normal degeneration of petals, but never happened in the expanding petals even if they were killed. Such contraction was found to be extensible again after petals were boiled.

4. The expanded petals were separated, and immersed in and injected with phosphate buffer solutions ($m/100$) of different pH values. The rolling was markedly pronounced in the high acidic solutions.

5. The petals in the buds contained a large quantity of starch in the epidermis which disappeared almost entirely after the flowers had opened. The rapid extension of the petals seems to be connected with the hydrolysis of the stored starch in the epidermis. The osmotic value of the epidermal cells of expanded petals was 0.1 mol lower than that of petals in the buds. The rapid water uptake and enlargement of cells during the petal expansion probably prevented them from increasing osmotic concentration.

Literature

- Ball, N. G., 1933: A physiological investigation of the ephemeral flowers of *Turnera ulmifolia*. New Phytologist 32, 13.
- Ban ch er, E., 1938: Zellphysiologische Untersuchung über den Abblühvorgang bei *Iris* und *Gladiolus*. Österr. bot. Z. 87, 221.
- Drawert, H., 1954: Über die Eignung zelleigener Anthocyane zur pH-Wert-Bestimmung des Zellsaftes. Protoplasma 44, 370.
- Eames, J., and L. H. MacDaniel, 1947: An introduction to plant anatomy, New York, p. 52.
- Lepeschkin, W. W., 1929: The cause of ephemerism in flowers. Amer. J. Bot. 16, 314.
- Schmucker, T., 1928: Die Bedingungen des nächtlichen Blühens von *Cereus grandiflorus*. Planta 5, 549.
- Schumacher, W., 1953: Weitere Beobachtungen über das Welken ephemerer Blüten. Planta 42, 42.
- Skutch, A. F., 1927: Anatomy of leaf of Banana, *Musa sapientum* L. var. Hort. Gros. Michel. Bot. Gaz. 84, 337.

Recherches autoradiographiques sur la formation du phragmoplaste

Par

M. J. Olszewska¹

Laboratoire de Morphologie animale, Université libre de Bruxelles

Avec 3 figures

(Reçu le 23 Mai 1960)

I. Introduction

Des recherches cytochimiques (Shimamura et Ota 1956; Idelman 1958 ; Olszewska, 1960 b) montrent que, au niveau du phragmoplaste, deux constituants seulement peuvent être décelés : l'ARN et les protéines ; ces dernières sont riches en groupements SH.

En utilisant de la méthionine ³⁵S, nous avons démontré, (Olszewska 1960) que la présence du phragmoplaste implique une incorporation accrue de cet acide aminé.

La kinétine, qui stimule la synthèse de l'ARN et des protéines (Olszewska 1959 a et b), accélère la formation du phragmoplaste ; ce fait a été constaté aussi bien *in vivo* que sur du matériel fixé (Olszewska 1959 c et non publ.).

Ces constatations nous ont permis de supposer que la formation du phragmoplaste serait conditionnée par la synthèse d'ARN et des protéines. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'incorporation de l'adénine et de trois acides aminés (leucine, phénylalanine et méthionine) pendant la division cellulaire. Certaines de ces expériences avaient pour but d'établir si la synthèse éventuelle d'ARN et de protéines se produit *in situ* à l'endroit même de la formation du phragmoplaste, ou si, au contraire, ces substances sont synthétisées dans le cytoplasme environnant pour être transférées par après dans la région interzonale (espace entre deux groupements de chromosomes-fils).

¹ Boursière de la Fondation Rockefeller ; adresse permanente : Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie végétales, Université de Lodz, Lodz, Pologne.

2. Matériel et méthodes

Toutes les expériences ont été faites sur le méristème racinaire d'*Allium cepa*. Après fixation dans un mélange de 95 p. d'alcool absolu et de 5 p. d'acide acétique glacial, les coupes à la paraffine d'une épaisseur de 8 μ , ont été recouvertes d'émulsion Ilford G 5 « in gel form », suivant la technique décrite par Ficq (1955).

Dans une première série d'expériences, des bulbes d'oignons, garnis de racines obtenues par trempage dans de l'eau du robinet, ont été divisées en parties égales : un fragment a servi de matériel témoin, les autres ont été prétraités soit à la kinétine (0,05 μ M/ml pendant 3,5 h.), soit à la caféine (0,5 μ M/ml pendant 1,5 h.) : on sait que cette substance inhibe la formation du phragmoplaste (Kihlman et Leván 1949).

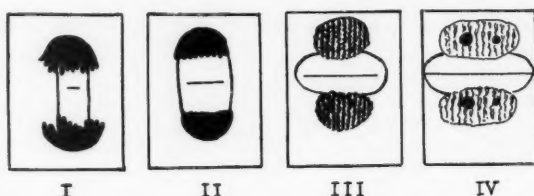


Fig. 1. Schéma représentant 4 étapes successives de la télophase dans le méristème racinaire d'*Allium cepa*. I — le début de la télophase : le phragmoplaste a l'aspect d'une bande étroite, II — télophase précoce : les chromosomes sont agglomérés, le phragmoplaste occupe toute la région interzonale, III — télophase moyenne : au niveau des chromosomes les chromonémas spiralés ainsi que des petits nucléoles sont visibles ; le phragmoplaste s'approche des membranes de la cellule maternelle, IV — télophase avancée : le noyau, entouré par la membrane nucléaire contient les chromonémas dés spiralés ; les parties les plus jeunes du phragmoplaste sont appliquées contre les membranes de la cellule maternelle ; à ce stade le phragmoplaste disparaît souvent du centre de la cellule.

Les précurseurs radioactifs ont été employés aux concentrations suivantes dans de l'eau distillée :

adénine-8- 14 C : 2,5 μ C et 0,5 μ M/ml ; temps d'exposition : 2 semaines.

dl-leucine-1- 14 C : 5 μ C et 0,5 μ M/ml ; temps d'exposition : 4 jours.

dl-phénylalanine-2- 14 C : 5,2 μ C et 2 μ M/ml ; temps d'exposition : 6 jours.

dl-méthionine 35 S : 4,6 μ C et 0,25 μ M/ml ; temps d'exposition : 2,5 jours.

Dans le cas du matériel prétraité à la kinétine ou à la caféine, les milieux d'incubation ont été additionnés de ces substances aux mêmes concentrations que pour les prétraitements.

La durée d'incubation en présence des précurseurs radioactifs a été de 30 min.

Dans le deuxième groupe d'expériences, destinées à suivre la localisation de la synthèse pour certains constituants du phragmoplaste, l'incubation avec le précurseur radioactif a été réduite à 5 min. et suivie d'une incubation de 25 min. avec le précurseur non marqué à la même concen-

tration. Dans ces expériences, qui n'ont porté que sur le matériel témoin, on a employé de l'adénine-8- ^{14}C ($25\ \mu\text{C}$ et $5\ \mu\text{M/ml}$, temps d'exposition : 6 jours), de la dl-leucine-1- ^{14}C ($20\ \mu\text{C}$ et $2\ \mu\text{M/ml}$, temps d'exposition : 5 jours) et de la dl-méthionine ^{35}S ($28,7\ \mu\text{C}$ et $2\ \mu\text{M/ml}$, temps d'exposition : 5 jours) en solution dans de l'eau distillée.

Pour calculer la surface occupée par le phragmoplaste, nous avons dessiné, à la chambre claire, sur du papier homogène, à l'agrandissement $1800\times$, 10 cellules pour chaque étape de la télophase (télophase précoce, moyenne et avancée) : le phragmoplaste, les chromosomes (noyaux) et le cytoplasme ont été découpés et pesés à 1 mg. près.

3. Résultats expérimentaux

Nous avons distingué, selon le degré de la régression des chromosomes et l'évolution du phragmoplaste, 4 étapes successives de la télophase dans le méristème racinaire d'*Allium cepa* (Fig. 1).

Les résultats concernant la surface occupée par le phragmoplaste sont présentés dans le Tableau 1.

Les données sur l'incorporation de l'adénine et des acides aminés, après 30 min. d'incubation, sont présentées dans les tableaux 2, 3, 4, 5 et Fig. 2.

Dans les anaphases tardives, la région interzonale contient le même nombre de traces provenant du ^{14}C des acides aminés que le cytoplasme environnant. En ce qui concerne l'adénine, la région interzonale n'est presque pas radioactive et c'est le début de la télophase qui déclenche une incorporation intense.

Les données sur l'incorporation dans le phragmoplaste représentent la moyenne des nombres de traces, comptées séparément pour les différents stades de développement du phragmoplaste. Quel que soit le précurseur, le nombre des traces s'accroît à mesure que le phragmoplaste s'élargit ; c'est toujours pendant la télophase avancée que le phragmoplaste est le plus radioactif.

Dans le matériel témoin la radioactivité du cytoplasme reste au même



Fig. 2. Incorporation de la méthionine ^{35}S dans le phragmoplaste (30 min. d'incubation).

Tableau 1. Surface (en %) occupée par les chromosomes (noyaux), le cytoplasme et le phragmoplaste au cours de la télophase dans le méristème racinaire d'*Allium cepa*.

Organite	Etape de la télophase		
	précoce	moyenne	avancée
chromosomes (noyaux)	19,2	18,9	22,9
phragmoplaste	18,9	23,1	22,7
cytoplasme	61,9	58,0	54,3

niveau pendant toute la télophase ; dans le matériel traité à la kinétine, elle augmente, mais elle reste toujours inférieure à celle du phragmoplaste.

Tableau 2. Incorporation de l'adénine-8-¹⁴C, exprimée en nombre de traces par cellule, dans le cytoplasme des cellules en interphase, en anaphase et en télophase dans le méristème d'*Allium cepa*.

Traitement	stade	nombre de cellules examinées	nombre de traces
témoin	interphase	1018	0,82
	anaphase	38	0,58
	télophase	257	phragm. 0,88 = 56,4% cytopl. 0,68 = 43,5%
kinétine	interphase	1082	1,55
	anaphase	46	0,87
	télophase	246	phragm. 1,64 = 57,5% cytopl. 1,21 = 42,4%
caféine	interphase	415	0,85
	anaphase	16	0,66
	télophase	93	0,92

Tableau 3. Incorporation de la dl-leucine-1-¹⁴C, exprimée en nombre de traces par cellule, dans le cytoplasme des cellules en interphase, en anaphase et en télophase dans le méristème racinaire d'*Allium cepa*.

Traitement	stade	nombre de cellules examinées	nombre de traces
témoin	interphase	475	1,02
	anaphase	32	0,84
	télophase	158	phragm. 0,65 = 46,1% cytopl. 0,76 = 53,9%
kinétine	interphase	890	1,50
	anaphase	25	0,99
	télophase	226	phragm. 1,40 = 56,0% cytopl. 1,10 = 44,0%
caféine	interphase	213	0,87
	anaphase	18	0,61
	télophase	33	0,76

Dans le matériel soumis à l'action de la caféine, on n'a envisagé que les télophases totalement dépourvues de phragmoplaste. Dans de telles cellules, au cours du déroulement de la télophase (estimé d'après le processus de la régression des chromosomes), la radioactivité du cytoplasme augmente

Tableau 4. Incorporation de la dl-phénylalanine-2-¹⁴C, exprimée en nombre de traces par cellule, dans le cytoplasme des cellules en interphase, en anaphase et en télophase dans le méristème racinaire d'*Allium cepa*.

Traitement	stade	nombre de cellules examinées	nombre de traces
témoin	interphase	635	0,65
	anaphase	17	1,01
	télophase	150	phragm. 0,68 = 52,3% cytopl. 0,62 = 47,6%
kinétine	interphase	1800	0,93
	anaphase	47	0,91
	télophase	415	phragm. 1,09 = 53,1% cytopl. 0,96 = 46,8%
caféine	interphase	288	0,52
	anaphase	15	0,33
	télophase	56	0,63

Tableau 5. Incorporation de la dl-méthionine ³⁵S, exprimée en nombre de traces par cellule, dans le cytoplasme des cellules en interphase, en anaphase et en télophase dans le méristème racinaire d'*Allium cepa*.

Traitement	stade	nombre de cellules examinées	nombre de traces
témoin	interphase	1522	0,72
	anaphase	51	0,42
	télophase	454	phragm. 0,96 = 58,8% cytopl. 0,76 = 44,1%
kinétine	interphase	607	1,54
	anaphase	39	0,87
	télophase	255	phragm. 1,86 = 51,3% cytopl. 1,76 = 48,6%
caféine	interphase	1315	0,73
	anaphase	17	0,38
	télophase	110	0,71

Tableau 6. Rapports entre les nombres de traces contenues dans le cytoplasme, y compris le phragmoplaste, de cellules en télophase et en interphase.

Traitement	précurseur			
	adénine	leucine	phénylalanine	méthionine
témoin	1,90	1,38	2,00	2,38
kinétine	1,84	1,78	2,20	2,35
caféine	1,08	0,87	1,21	0,97

légèrement ; toutefois, dans le cas de la méthionine, elle reste à un niveau constant.

Tableau 7. Incorporation de l'adénine-8-¹⁴C dans les cellules du méristème radiculaire d'*Allium cepa* ; incubation pendant 5 min. avec l'adénine radioactive, suivie d'une incubation durant 25 min. avec l'adénine non marquée.

Etape de la télophase	nombre de cellules examinées	nombre de traces		
		phragmoplaste	cytoplasme	total
précoce.....	83	0,08 = 5,0%	1,54 = 95,0%	1,62
moyenne	62	0,35 = 30,0%	0,82 = 70,0%	1,17
avancée	25	1,44 = 69,2%	0,64 = 30,7%	2,08

Tableau 8. Incorporation de la leucine-1-¹⁴C dans les cellules du méristème radiculaire d'*Allium cepa* ; incubation pendant 5 min. avec la leucine radioactive, suivie d'une incubation durant 25 min. avec la leucine non marquée.

Etape de la télophase	nombre de cellules examinées	nombre de traces		
		phragmoplaste	cytoplasme	total
précoce.....	59	0,55 = 25,4%	1,61 = 74,6%	2,16
moyenne	69	0,73 = 33,7%	1,43 = 66,6%	2,16
avancée	22	1,54 = 51,5%	1,45 = 48,5%	2,99

Tableau 9. Incorporation de la dl-méthionine ³⁵S dans les cellules du méristème radiculaire d'*Allium cepa* ; incubation pendant 5 min. avec la méthionine radioactive, suivie d'une incubation durant 25 min. avec la méthionine non marquée.

Etape de la télophase	nombre de cellules examinées	nombre de traces		
		phragmoplaste	cytoplasme	total
précoce.....	110	0,57 = 17,9%	2,60 = 82,1%	3,17
moyenne	139	1,03 = 31,0%	2,29 = 68,9%	3,32
avancée	61	1,85 = 50,5%	1,81 = 49,5%	3,66

Les résultats du deuxième groupe d'expériences sont présentés dans les tableaux 7, 8, 9 et Fig. 3.

Le matériel, qui a subi le traitement total (incubation pendant 5 min.

avec le précurseur radioactif, suivie d'une incubation durant 25 min. avec le même précurseur non marqué) montre, après le même temps d'exposition, une radioactivité 2-3-fois plus élevée que le matériel fixé directement après 5 min. d'incubation avec le précurseur radioactif.

L'incorporation de l'adénine (Tableau 7) montre que, dans les télophases précoces, le phragmoplaste est dépourvu de traces, tandis que le cytoplasme environnant est radioactif (Fig. 3 *b*). Dans les télophases avancées, au contraire, le phragmoplaste est plus radioactif que le cytoplasme (Fig. 3 *c*) : ce résultat ressemble beaucoup à celui obtenu pour l'incorporation de l'adénine ^{14}C après 30 min. d'incubation (Tableau 2).

Il faut noter que, après 5 min. d'incubation avec l'adénine- ^{14}C le phragmoplaste dès le début de sa formation (visible sous la forme d'une bande



Fig. 3. Incorporation de l'adénine-8- ^{14}C dans les cellules en télophase. *a* après 5 min. d'incubation ; début de la formation du phragmoplaste : phragmoplaste marqué, cytoplasme non marqué. *b* et *c* 5 min. d'incubation avec l'adénine marqué, suivie de 25 min. de l'incubation avec l'adénine non marqué : *b* — télophase précoce, phragmoplaste non marqué entouré de cytoplasme marqué ; *c* — télophase avancée, phragmoplaste et cytoplasme également marqués.

étroite) est fortement marqué (Fig. 3 *a*), tandis que le cytoplasme n'est pas radioactif.

En ce qui concerne l'incorporation de la leucine et de la méthionine (Tableau 8 et 9), la radioactivité du phragmoplaste au stade de la télophase précoce est réduite : elle n'atteint que le quart de la radioactivité du cytoplasme environnant. Le phragmoplaste, pendant la télophase avancée, est, par contre, plus radioactif que le cytoplasme ; ce résultat est comparable à celui obtenu dans le cas de l'adénine (Tableau 7).

4. Discussion

Nos résultats montrent que la formation du phragmoplaste s'accompagne d'une incorporation intense de l'adénine et des acides aminés : quand il existe un phragmoplaste, les cellules en télophase contiennent env. 2-fois plus de traces que les cellules en interphase ; par contre, dans le cas où le phragmoplaste ne se forme pas (matériel traité à la caféine), ce rapport est proche de 1 (Tableau 6). La kinétine semble stimuler l'incorporation liée à la formation du phragmoplaste avec la même intensité que l'incor-

poration dans le cytoplasme des cellules en interphase ; il faut noter néanmoins que, pour la leucine et la phénylalanine, le rapport entre les nombres de traces dans les cellules en interphase et en télophase est un peu plus élevé que dans le matériel témoin (Tableau 6).

La surface du phragmoplaste représente, tout au plus, la moitié de celle du cytoplasme environnant (Tableau 1) ; cependant, le nombre de traces observées dans le phragmoplaste est égal (ou même dépasse) celui du cytoplasme ; on peut en conclure que le phragmoplaste est le siège d'une incorporation de précurseurs beaucoup plus intense que le restant du cytoplasme. Signalons toutefois que la densité du phragmoplaste (mesurée au microscope à interférence) est un peu plus élevée que celle du cytoplasme (B a j e r, *communic. per.*).

Parmi les trois acides aminés étudiés, la méthionine semble jouer un rôle particulièrement important dans le phragmoplaste.

Nous pouvons conclure de nos expériences, dont les résultats sont résumés dans les Tableaux 7, 8 et 9, que, dans le cas de l'adénine, l'incorporation dans le phragmoplaste est indépendante de celle qui se produit dans le cytoplasme environnant : en effet, le phragmoplaste qui se forme en l'absence de précurseur radioactif ne se marque pas, bien qu'il soit entouré de cytoplasme radioactif. Dans ces expériences, nous avons pu suivre tous les stades intermédiaires du marquage du phragmoplaste : il est radioactif, s'il s'est formé en présence du précurseur marqué (télophases avancées) ; le nombre des traces diminue au fur et à mesure que la quantité du précurseur radioactif, s'il a été éliminé du milieu, décroît (télophases moyennes) ; enfin la radioactivité du phragmoplaste est fortement réduite dans les télophases précoces.

Il est possible qu'une certaine quantité de protéines se déplace du cytoplasme vers le phragmoplaste. Mais il faut tenir compte que les résultats sont obtenus par un défaut inévitable de la technique : le remplacement du précurseur marqué par le même précurseur non marqué n'interrompt pas l'incorporation de composés radioactifs plus complexes, déjà formés. Nous avons constaté, en effet, que la radioactivité des cellules augmente considérablement après qu'elles ont été transférées dans le milieu non radioactif.

Bien que la méthode autoradiographique, avec application des précurseurs spécifiques, ne puisse démontrer directement une synthèse nette, il est permis de penser que, dans nos expériences, l'incorporation accrue résulte d'une synthèse intense se produisant au niveau du phragmoplaste.

Rappelons que la région interzonale, qui est non radioactive à la fin de l'anaphase se marque fortement dès l'apparition du phragmoplaste et que l'adénine, après 5 min. d'incubation, s'incorpore rapidement dans le phragmoplaste en voie de formation. Ces constatations font supposer que la synthèse de l'ARN précéderait celle des protéines ; toutefois, elles coexistent pendant toute la période de développement du phragmoplaste.

La synthèse des protéines du phragmoplaste est donc étroitement liée, comme dans tous les systèmes biologiques étudiés (B r a c h e t 1957) à celle de l'ARN.

5. Résumé

Nous avons étudié, par autoradiographie, l'incorporation de l'adénine ^{14}C et de trois acides aminés (leucine ^{14}C , phénylalanine ^{14}C , méthionine ^{35}S) au cours de la formation du phragmoplaste dans les cellules du méristème racinaire d'*Allium cepa*.

Cette étude a montré que :

1° La présence du phragmoplaste est liée à une incorporation accrue des divers précurseurs radioactifs.

2° Le phragmoplaste est le siège d'une incorporation plus intense que le cytoplasme environnant.

3° Les protéines et surtout l'ARN contenus dans le phragmoplaste sont synthétisés *in situ*.

4° La synthèse de l'ARN précède celle des protéines.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einbau von RNS- und Protein-Prekursoren (Adenin ^{14}C , Phenylalanin ^{14}C , Methionin ^{35}S , Leucin ^{14}C) mit Hilfe der Autoradiographie im Laufe der Bildung des Phragmoplastes im Wurzelmeristem verfolgt.

Folgende Resultate wurden erhalten :

1° Die Anwesenheit des Phragmoplastes ist verbunden mit der Steigerung des Einbaues von markierten Prekursoren.

2° Der Einbau ist im Phragmoplast viel intensiver als im umgebenden Cytoplasma.

3° Proteine und vor allem die im Phragmoplast vorhandene RNS werden *in situ* synthetisiert.

4° RNS unterstützt die Proteinsynthese.

Nous tenons à exprimer à Monsieur le Professeur J. Brachet notre profonde gratitude pour l'accueil qu'il nous a réservé dans son laboratoire et pour les conseils et les encouragements qu'il nous a prodigués. Nous remercions vivement Monsieur le Professeur M. Errera qui a bien voulu nous aider de ses suggestions fructueuses.

Bibliographie

Bajer, A.: Communication personnelle.

Brachet, J., 1957: Biochemical Cytology. Academic Press, Inc. Publ., New York.

Ficq, A., 1955: Étude autoradiographique du métabolisme de l'oocyte d'*Asterias rubens* au cours de la croissance. Arch. Biol. 66, 509.

Idelman, S., 1958: Les lipides et les groupements sulphydrilés liés aux protéines au cours de la mitose de *Tradescantia reflexa*. C. r. ac. sci. 246, 3499.

Kihlman, B., and A. Levan, 1949: The cytological effect of caffeine. Hereditas 35, 109.

Olszewska, M. J., 1959 a: Étude autoradiographique de l'influence de la kinétine sur l'incorporation de l'adénine dans le méristème racinaire d'*Allium cepa*. Exper. Cell Res. 16, 193.

- Olszewska, M. J., 1959 b: Étude autoradiographique de l'influence de la kinétine sur la synthèse des acides nucléiques et des protéines dans le méristème racinaire d'*Allium cepa*. Acta Soc. Bot. Pol. 28, 175.
- 1959 c: Observations vitales de l'influence de la kinétine sur la durée des certains stades de la mitose. Acta Soc. Bot. Pol. 28, 471.
- 1960 a: L'incorporation de la dl-méthionine ^{35}S dans le cytoplasme des cellules en interphase et en télophase du méristème racinaire d'*Allium cepa*. Arch. Intern. Phys. Bioch. 68, 412.
- 1960 b: Recherches sur le caractère chimique de la plaque cellulaire. Acta Soc. Bot. Pol. 29, 249.
- Shimamura, T., and T. Ōta, 1956: Cytochemical studies on mitotic spindle and the phragmoplast of plant cells. Exper. Cell Res. 11, 546.

L'effet de β -mercaptoéthanol et de l'urée sur la structure du phragmoplaste

Par

M. J. Olszewska¹

Laboratoire de Morphologie animale, Université libre de Bruxelles

Avec 7 figures

(Reçu le 28 Mai 1960)

Introduction

Le phragmoplaste examiné *in vivo* au microscope ordinaire est d'apparence homogène, tandis que, dans le matériel fixé aux fixateurs acides, des structures filamenteuses caractéristiques y sont visibles. C'est pourquoi la réalité de ces structures a été discutée jusqu'à la publication des recherches de Inoué (1953), faites en lumière polarisée. Cet auteur a démontré que, dans les cellules vivantes, le phragmoplaste a une structure analogue à celle qui a été observée dans le matériel fixé.

Les filaments du phragmoplaste sont beaucoup moins visibles au microscope électronique, après fixation au OsO_4 (Buvat et Puissant 1958, Porter et Machado 1960). Néanmoins, ces auteurs les décrivent comme des faisceaux de petits tubules, de nature ergastoplasmique, entourés des granules identiques aux grains de Palade.

Bien que le rôle du phragmoplaste et celui de l'appareil mitotique soient différents, il nous semble logique de penser que leurs structures, à certains points de vue, sont comparables.

En effet, l'ARN et les protéines sont présents tant dans le phragmoplaste que dans l'appareil mitotique (Shimamura et Ota, 1956). Inoué (1953) a observé, en lumière polarisée, une biréfringence positive au niveau de l'appareil mitotique, analogue à celle qu'il a trouvée dans le phragmoplaste. Mazià (1955), après avoir étudié l'action urée sur l'appareil mitotique isolé, a conclu qu'il s'y trouve des ponts hydrogènes secondaires ; mais les chaînes protéiques, qui constituent la structure fondamentale, sont liées

¹ Boursière de la Fondation Rockefeller ; adresse permanente : Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie végétales, Université de Łódź, Łódź, Pologne.

par des ponts S-S; ces ponts S-S sont rompus par le β -mercaptoéthanol (Mazia 1958) qui les réduit en groupes —SH.

Nous nous sommes proposés, par analogie avec les travaux de Mazia (1955, 1958), d'étudier l'action de l'urée et du β -mercaptoéthanol sur le phragmoplaste. Etant donné que la formation du phragmoplaste est accompagnée d'une synthèse d'ARN et de protéines (Olszewska 1960, 1961), nous avons recherché si l'urée et le β -mercaptoéthanol ont une action sur l'incorporation de certains précurseurs marqués dans ce constituant de la cellule végétale en mitose.

Matériel et méthodes

Toutes nos observations ont porté sur le méristème radiculaire d'*Allium cepa*. Pour rendre plus visible la structure du phragmoplaste, nous avons utilisé des fixateurs acides : alcool-acétique 3 : 1 à la température normale et alcool-acétique 19 : 1 à -8°C (racines destinées aux tests autoradiographiques). Les coupes à la paraffine, d'une épaisseur de 8μ , ont été colorées par la méthode d'Unna. Cette coloration a été précédée, dans certains cas, par une digestion soit par la ribonucléase (Armour, 0,1 mg/ml, 2 h. à 37°), soit par la trypsine (0,1 mg/ml dans le tampon phosphate 0,05 M, 1 h. à 37°) ou la pepsine (2 mg/ml dans HCl 0,02 N, 2 h. à 37°C) (Pearse 1953).

Le β -mercaptoéthanol a été utilisé pendant 0,5 h. à la même concentration que dans les recherches de Mazia (1958), c'est-à-dire 0,1 M dans de l'eau distillée. Pour que l'action de l'urée ne soit pas létale, la concentration en urée a été réduite à 0,6 M (solution aqueuse), mais la durée du traitement a été de 3 h. (d'après Putnam, 1953, l'action dépolymérisante de l'urée se constate à partir de 0,5 M).

L'action du β -mercaptoéthanol et de l'urée a été étudiée par la méthode autoradiographique décrite par Ficq (1955) ; l'émulsion Ilford G5 « in gel form » a été utilisée. On a employé surtout de la méthionine ^{35}S , comme traceur, cet acide aminé s'incorporant de façon particulièrement intense au cours de la télophase (Olszewska 1960, 1961).

Les racines ont été placées pendant 0,5 h. dans une solution aqueuse contenant de la dl-méthionine ^{35}S à la concentration 0,6 μM et 6,66 $\mu\text{C/ml}$, à laquelle on a ajouté du β -mercaptoéthanol (0,1 M) ; pour les racines témoins, le milieu d'incubation était simplement de l'eau distillée. Le temps d'exposition a été de 2 jours.

Le matériel prétraité à l'urée (0,6 M) pendant 2,5 h. a été ensuite traité pendant 0,5 h. par une solution aqueuse de dl-méthionine ^{35}S , contenant 0,25 μM et 4,6 $\mu\text{C/ml}$, additionnée d'urée à la même concentration que pour le prétraitement. Les racines témoins ont été seulement incubées avec de la méthionine marquée. Les lames ont été développées après 3,5 jours d'exposition. On a procédé de la même manière avec l'adénine-8- ^{14}C (0,5 μM et 2,5 $\mu\text{C/ml}$; temps d'exposition 2 semaines) et avec la glycine ^{14}C (1 μM et

1 μ C/ml). L'incorporation de cette dernière a été mesurée au compteur ; on n'a examiné que la radioactivité totale et celle de la fraction acidsoluble (10 racines d'une longueur de 2 mm. pour chaque expérience).

4 étapes successives de la télophase ont été distinguées comme précédemment (Olszewska 1961).

Résultats expérimentaux

a) Caractère chimique des structures filamenteuses du phragmoplaste

Le traitement des coupes à la ribonucléase ne détruit pas la structure du phragmoplaste, bien que toute son affinité pour la pyronine soit enlevée (Fig. 1 et 2).

Après la digestion soit par la trypsine, soit par la pepsine, ces structures sont altérées. Les structures caractéristiques du phragmoplaste disparaissent entièrement quand les coupes sont soumises successivement à l'action de ces deux enzymes (Fig. 3).

b) Effet du β -mercaptoéthanol sur le phragmoplaste

L'incubation par le β -mercaptoéthanol empêche l'apparition du phragmoplaste dans un certain nombre de cellules en télophase (Tableau 1). Le plus souvent, surtout dans les télophases précoces et moyennes, son action s'exprime par une inhibition partielle de la formation du phragmoplaste : sa largeur est considérablement réduite, mais les structures encore reconnaissables présentent un aspect normal (Fig. 4 et Tableau 1). Les phragmoplastes des télophases avancées (Tableau 1) sont peu sensibles à l'action du β -mercaptoéthanol.

Tableau 1. Influence du β -mercaptoéthanol sur la formation du phragmoplaste dans le méristème racinaire d'*Allium cepa*. (199 cellules examinées).

Anomalie	étape de la télophase		
	précoce	moyenne	avancée
absence du phragmoplaste	22,9%	8,3%	11,1%
formation du phragmoplaste partiellement inhibée	65,5%	49,6%	5,5%
phragmoplaste normal	11,4%	41,9%	83,3%

20 min. après le remplacement de la solution de β -mercaptoéthanol par de l'eau distillée, la formation du phragmoplaste reprend : toutes les cellules en télophase en sont pourvues. Cependant, dans de nombreux cas, le développement du phragmoplaste est retardé et son aspect n'est pas en

rapport avec le degré de régression des chromosomes. C'est, pour cette raison, que nous considérons de telles cellules comme des « cytocinèses retardées » (Tableau 2 et 3). Dans ce matériel, on rencontre des cellules dont les noyaux-fils sont entièrement reconstitués et qui contiennent le phragmoplaste ; sa taille est celle qu'il a lors de la télophase moyenne (Fig. 5).

40 min. après l'élimination du β -mercaptoéthanol, le nombre des cytocinèses retardées diminue (Tableau 3) ; mais, comme dans l'expérience précédente, c'est au cours des télophases avancées qu'elles sont les plus fréquentes.

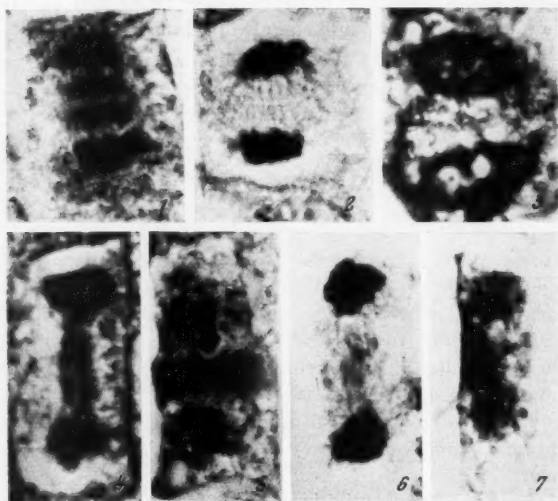


Fig. 1. Télophase dans le matériel témoin coloré par l'Unna.

Fig. 2. Télophase dans le matériel témoin ; la coloration à l'Unna a été précédée par l'action de la ribonucléase.

Fig. 3. Télophase dans le matériel témoin ; la coloration à l'Unna a été précédée par l'action de la trypsine et de la pepsine.

Fig. 4. Télophase en présence de β -mercaptoéthanol : la régression des chromosomes est plus avancée que dans la Fig. 1, mais le phragmoplaste se présente sous la forme d'une bande étroite.

Fig. 5. Cytocinèse dans le matériel soumis pendant 30 min. à l'action du β -mercaptoéthanol, puis transféré durant 20 min. dans de l'eau distillée : les noyaux-fils sont entièrement reconstitués tandis que le phragmoplaste est en plein développement.

Fig. 6. Télophase dans le matériel soumis à l'action de l'urée : la formation du phragmoplaste est inhibée.

Fig. 7. Télophase dans le matériel soumis à l'action de l'urée : le phragmoplaste est partiellement détruit et présente un aspect ressemblant à celui que l'on observe après la digestion par des protéases (Fig. 3).

L'effet de β -mercaptoéthanol et de l'urée sur la structure du phragmoplaste 401

Dans le matériel soumis à l'action du β -mercaptoéthanol, nous n'avons jamais rencontré de cellules binucléées ; cette constatation confirme que l'effet du β -mercaptoéthanol est entièrement réversible.

Il faut ajouter que, les anomalies qui se produisent au niveau de l'appareil mitotique sont semblables à celles que l'on trouve dans le phragmoplaste, dans les cellules soumises à l'action du β -mercaptoéthanol.

Tableau 2. Formation du phragmoplaste dans le méristème racinaire d'*Allium cepa*, soumis pendant 30 min. à l'action du β -mercaptoéthanol, puis transféré, durant 20 min. dans de l'eau distillée (325 cellules examinées).

Dérroulement des cytokinèses	étape de la télophase		
	précoce	moyenne	avancée
cytokinèses retardées	22,3%	24,1%	59,8%
cytokinèses normales	77,7%	75,8%	40,2%

Ce dernier n'inhibe pas l'incorporation de la méthionine ^{35}S dans les cellules en interphase ; le nombre de traces est le même que dans le matériel témoin (0,83 par cellule). L'incorporation dans les cellules en télophase est,

Tableau 3. Formation du phragmoplaste dans le méristème racinaire d'*Allium cepa*, soumis pendant 30 min. à l'action du β -mercaptoéthanol puis transféré, durant 40 min., dans de l'eau distillée (231 cellules examinées).

Dérroulement des cytokinèses	étape de la télophase		
	précoce	moyenne	avancée
cytokinèses retardées	11,1%	16,0%	20,9%
cytokinèses normales	88,9%	84,0%	79,1%

par contre, diminuée de 37% ; or, nous avons montré précédemment (Olszewska 1960, 1961) que la formation du phragmoplaste s'accompagne d'une incorporation intense de cet acide aminé.

c) Effets de l'urée sur le phragmoplaste

Dans le matériel soumis à l'action de l'urée, trois cas peuvent se présenter : 1) le phragmoplaste ne se forme pas, 2) sa formation est inhibée (Fig. 6), 3) le phragmoplaste présente un aspect qui ressemble beaucoup à celui obtenu après digestion par des protéases (Fig. 7). Ces anomalies se produisent au cours de toutes les étapes de la télophase.

Sous l'influence de l'urée, l'incorporation de la méthionine ^{35}S dans le cytoplasme des cellules en interphase est fortement réduite ; elle ne représente que le tiers de celle du matériel témoin. Dans les cellules en télophase, la radioactivité du cytoplasme est presque nulle dans les racines incubées avec l'urée. Des résultats analogues ont été obtenus au compteur avec de la glycine ^{14}C (Tableau 4) comme précurseur.

Tableau 4. Radioactivité du méristème racinaire d'*Allium cepa* incubé avec la glycine ^{14}C , exprimée en c. min./racine.

Traitement	radioactivité	
	totale	fraction acidosoluble en %
témoin	1072	71
urée	362	71

On ne constate pas d'effet inhibiteur de l'urée sur l'incorporation de l'adénine ^{14}C . Le cytoplasme des cellules en interphase contient toujours le même nombre de traces dans le matériel témoin (0,82 par cellules) que dans celui qui a été traité à l'urée (0,79).

Discussion

Les structures fibrillaires du phragmoplaste sont constituées de protéines ; elles résistent à l'action de la ribonucléase qui enlève pourtant tout l'ARN contenu dans le phragmoplaste, mais elles sont totalement détruites par les protéases.

L'action du β -mercaptoéthanol sur le phragmoplaste est entièrement comparable à celle qui a été constatée dans le cas de l'appareil mitotique des œufs d'oursin par Mazia (1958). Ces ressemblances peuvent être résumées de la façon suivante : 1° Dans le méristème racinaire d'oignon, le β -mercaptoéthanol attaque tant l'appareil mitotique que le phragmoplaste. 2° Les structures du phragmoplaste formées précédemment ne sont pas démolies sous l'action du β -mercaptoéthanol (peu de perturbations au cours de la télophase avancée, Tableau 1). 3° L'action du β -mercaptoéthanol est réversible (cytocinèses retardées qui apparaissent après l'élimination du β -mercaptoéthanol du milieu, absence de cellules binucléées). 4° La toxicité négligeable du β -mercaptoéthanol (l'incorporation de la méthionine ^{35}S est normale).

Il en résulte que toutes les considérations de Mazia (1958) concernant l'action du β -mercaptoéthanol sur l'appareil mitotique sont applicables au cas du phragmoplaste : le β -mercaptoéthanol empêche la formation des ponts S—S entre les protéines, soit par inhibition de l'oxydation du groupe-

ment SH lié aux protéines, soit par la compétition avec les groupements SH protéiques. Nous pouvons donc conclure que des liaisons S—S doivent exister entre les protéines qui donnent la structure fibrillaire au phragmoplaste.

L'influence de l'urée sur le phragmoplaste est beaucoup plus complexe. L'urée inhibe considérablement l'incorporation des acides aminés marqués. En raison de l'action dépolymérisante de l'urée sur les protéines *in vitro*, on pouvait s'attendre à ce que la plus grande partie de la radioactivité passe dans la fraction acidosoluble. Or, il n'en est rien ; la radioactivité de la fraction acidosoluble est la même que dans le matériel témoin. On sait qu'une synthèse de protéines est nécessaire pour que le phragmoplaste puisse se former (Olszewska 1961) ; il est bien possible que l'inhibition de cette synthèse par l'urée soit la raison pour laquelle le phragmoplaste n'existe pas dans certaines cellules. D'autre part, l'effet destructeur de l'urée sur la structure du phragmoplaste déjà formé (qui présente alors le même aspect qu'après une digestion par les protéases), laisse à penser que des liaisons hydrogènes pourraient exister entre les protéines du phragmoplaste.

Résumé

Les fibrilles constitutives du phragmoplaste sont de nature protéique. L'action du β -mercaptoéthanol permet de conclure que ces protéines sont liées par des ponts S—S. En présence d'urée, la structure du phragmoplaste est détruite, ce qui indique l'existence de liaisons hydrogènes.

Zusammenfassung

Unsere Arbeit führt zu folgenden Resultaten: 1. Die im Phragmoplast befindliche Faserstruktur besitzt einen Eiweißstoffcharakter. 2. Der Effekt des β -Merkaptoäthanol gestattet die Annahme, daß die Proteine mit S—S-Brücken verbunden sind. 3. Bei Anwesenheit von Harnstoff wird die Phragmoplaststruktur zerstört, was für das Vorhandensein von H-Brücken spricht.

Nous désirons exprimer notre profonde reconnaissance envers M. le Professeur J. Brachet qui a suggéré ce travail en nous aidant constamment de ses conseils et de ses critiques bienveillantes.

Bibliographie

- Buvat, R., et A. Puissant, 1958: Observations sur la cytodièrese et l'origine des plasmodesmes. C. r. acad. sci. 247, 233.
- Ficq, A., 1955: Étude autoradiographique du métabolisme de l'oocyte d'*Asterias rubens* au cours de la croissance. Arch. Biol. 66, 509.
- Inoué, S., 1955: Polarisation optical studies on the mitotic spindle. I. The demonstration of spindle fibers in living cells. Chromosoma 5, 487.
- Mazia, D., 1955: The organisation of the mitotic apparatus. Symp. Soc. Exper. Biol. 9, 335.
- 1958: SH compounds in mitosis. The action of mercaptoethanol on the eggs of the sand dollar *Dendraster excentricus*. Exper. Cell Res. 14, 488.

- Olszewska, M. J., 1960: L'incorporation de la dl-méthionine ^{35}S dans le cytoplasme des cellules en interphase et en télophase du méristème racinaire d'*Allium cepa*. Arch. Intern. Phys. Biochem. 68, 412.
- 1961: Recherches autoradiographiques sur la formation du phragmoplaste. Protoplasma, 53, 387.
- Pearse, A. G. E., 1953: Histochemistry theoretical and applied. J. a. A. Churchill Ltd., London.
- Porter, K. R., and R. D. Machado, 1960: Studies on endoplasmic reticulum. IV. Its form and distribution during mitosis in cells of onion root tip. J. Bioph. a. Biochem. Cytol. 7, 167.
- Putnam, F. W., 1953: Protein denaturation. The proteins, vol. I, part B. Academic Press Inc. Publ., New York.
- Shimamura, T., and T. Ôta, 1956: Cytochemical studies on the mitotic spindle and the phragmoplast of plant cells. Exper. Cell Res. 11, 346.

Studies on the Chromoplasts of Carrots

By

W. Straus

Laboratoire de Morphologie Animale, Université Libre de Bruxelles

With 14 Figures

(Received June 10, 1960)

A. Introduction

During the second half of the last century, the chromoplasts of plant cells excited the curiosity of many investigators, among whom were Weiss (1864, 1866), Kraus (1872), Schimper (1883, 1885), Meyer (1883 a), Fritsch (1883), and Courchet (1888). They made detailed studies of the yellow and orange plastids and attempted to understand how the great variety of chromoplast forms develop. In addition to round and oval forms which are similar to chloroplasts, the chromoplasts can also appear as filaments, spindles, rings, spirals, triangles, tetraeders, pentaeders, hexaeders, or crystal-like bodies with concavely or convexly curved sides and drawn-out points. Schimper (1883) held the opinion at first that the crystal-like shapes were due to a protoplasmic framework which he related to "protein crystals" observed in certain leucoplasts. Meyer (1883 a) held, in contrast to Schimper, that the crystal-like shapes were caused by the crystallisation of the pigments. Schimper (1885) later conceded that crystallisation of the pigments does occur in the chromoplasts. Other botanists tried to explain the unusual shapes of the chromoplasts by more dynamic processes. Hofmeister (1867) thought that the different lengths of the drawn-out points of certain chromoplasts were caused by different rates of growth. Weiss (1864, 1866), Kraus (1872), and Fritsch (1883) concluded that the pointed chromoplasts were derived from round precursors by a process of vacuolization and disruption, and that the particular shapes were determined by the way in which the vacuoles fuse, come to the surface and disrupt the bodies. In this century, few botanists have made detailed investigations on the origin and development of chromoplasts although great progress has been made, especially through the work of Karrer and Zechmeister, on the chemistry

of the carotinoid pigments. Only Guilliermond (1917, 1919) has made new observations on the development of chromoplasts by describing their derivation from rod-shaped and filamentous mitochondria.

Whereas many chromoplasts develop from colorless precursors (leucoplasts), others pass through the stage of chloroplasts (Meyer 1883, Schimper 1885). The problem of the development of the chloroplasts will therefore be considered briefly. The early botanists believed that the chloroplasts develop directly from the cytoplasm. Mohl (1855), Sachs (1862), Hofmeister (1867), Strasburger (1876), and others noted that areas of increased light reflection, often showing polygonal outlines, appear in the cytoplasm prior to the development of the pigments. Schimper (1880) originally shared this opinion but changed it when Schmitz (1883) and also he himself observed that differentiated plastids are already present in embryonic cells. Schimper (1883) and Meyer (1883 b) therefore concluded that plastids are never formed *de novo* but are derived by division from other plastids which pre-exist in embryonic cells and are transmitted through them to the next generation. During the years from 1910 to 1930, many botanists believed that plastids develop from mitochondria. However, according to Sorokin (1941), de Rezende-Pinto (1952), and Weier and Stocking (1952), mitochondria and plastids represent different organelles of the plant cells. Straus (1953) has pointed out that plastids might well develop from submicroscopic precursors and therefore might appear to develop from the cytoplasm *de novo*.

The problem of the origin and development of the chloroplasts and chromoplasts has important genetic implications. It is known that plastids can divide and that some of their properties can be transmitted by extra-nuclear inheritance. During the last few years, several attempts have been made to reach a better understanding of the development of the chloroplasts and to discover which constituents are responsible for their genetic continuity. This question, and its possible relationship to the problem of the chromoplasts, will be discussed briefly in the last section.

The work on chromoplasts of carrots, reviewed in the following pages, started from an accidental observation. After having investigated the properties of colloidal carotene solutions under the direction of Professor P. Karrer (Karrer and Straus 1938, Straus 1939), the author examined carrot juice under the microscope. It had been generally assumed at that time that the orange and red "crystals" in carrot cells and carrot juice, were crystals of carotene, and that they were either completely detached from the plastids or accompanied by only small remnants of plastid material (Fritsch 1883, Meyer 1883 a, Schimper 1885, Courchet 1888, Guilliermond et al. 1933, Weier 1942). However, the first exploratory examination of these "crystals" and especially of their disintegration forms led to doubts as to whether this interpretation was correct (Straus 1939). In order to clarify the nature of the "crystals," experiments were performed during 1942 and 1943 at the Botanical Institute of the University of Geneva

(Switzerland), and, sporadically, during the years 1950 to 1955 at the department of Pathology, State University Medical College of New York¹. The aims of these investigations were to make *in situ* observations on the forms and development of the chromoplasts of carrots (1953), to isolate them from the cells (1942 a, 1942 b, 1956), to analyze some of their biologically important constituents (1954, 1956), to determine the microscopic structure of the "stroma"² (1943, 1950) and the state of their pigments (1939, 1953, 1956). Since the major time of the author was taken up with animal cell problems the work on chromoplasts has remained very fragmentary.

B. Observations on chromoplasts in living cells of carrot

1. Forms of chromoplasts in carrot cells (Straus 1953).

—The observations were made on carrot slices in 8% sucrose solution (cyclosis).

According to their shapes, the following types of orange and red chromoplasts were distinguished: 1. filamentous; 2. round or curved; 3. polygonal; 4. spiral; 5. mixed. The majority of the chromoplasts belong into the polygonal class. Most of them are tetragonal, rectangular plates but triangular, pentagonal and hexagonal forms are sometimes found. The tetragonal sheets and ribbons can reach giant size and fill a large portion of the cells, especially in the outer phloem cells of thick carrots. The orange sheets and ribbons are often curved. With increasing age and the accumulation of pigments, the chromoplasts grow thicker, become straight and turn red (Straus 1956). Whereas the small polygonal chromoplasts resemble carotene crystals and often have been confused with them, the other forms (orange rings, spirals, filaments, etc.) do not resemble carotene crystals.

2. Development of chromoplasts in carrot (Straus 1953).—It was observed on living cells (cyclosis) of the xylem that colorless cytoplasmic areas which show ameboid movement duplicate the shapes of the chromoplasts. The hypothesis was made that these structures represent the precursors of the chromoplasts and that the development of their forms is related to sol-gel changes of the cytoplasm. The following types of colorless cytoplasmic areas in ameboid movement were distinguished: 1. round (discs and rings); 2. linear and angular (fibers, and plates delimited by these fibers); 3. mixed (discs transforming into polygonal plates, straight fibers transforming into rings). Most of these areas have submicroscopic dimensions. They can be recognized when their surrounding membranes ("border fibers") are visible in the microscope, or when they

¹ I am indebted to Professor F. Chodat, chairman of the department of Botany, University of Geneva, and to Professor Jean Oliver, former chairman of the department of pathology, State University Medical College of New York, for having allowed me to work on chromoplasts in their departments. I am also grateful to Professor F. Weber for having asked me to review my work for "Protoplasma."

² The term "stroma" is used in this report to designate the non-pigmented portion of the chromoplast. It does not imply a distinction between "stroma" and "grana."

show the beginning of the orange or red pigmentation. It was suggested that the filamentous chromoplasts are derived from the fibers surrounding these colorless areas. The greater thickness of the surrounding fibers compared to that of the inner portions can still be recognized in fully developed chromoplasts.

C. Observations on isolated chromoplasts of carrot

1. Isolation procedures (Straus 1942 a, 1942 b, 1956).—Not much progress could be made with the *in vitro* study of the chromoplasts before it was possible to isolate them with a high degree of purity. The first preparations obtained from carrot juice by repeated agglutination at pH 5–6 and resuspension at pH 8–9, contained, in addition to intact chromoplasts, many fragments of disintegrating chromoplasts and other cytoplasmic granules. Later, the chromoplasts were purified by agglutination at pH 5–6, followed by “differential resuspension” of the sediment at the same pH. The resulting preparations contained approximately 5% carotene corresponding to 20 to 30% of intact chromoplasts (Straus 1942 b). The low degree of purity of these preparations could only be fully appreciated later when a comparison could be made with highly purified preparations.

Very pure intact chromoplasts of carrot were obtained by flotation combined with differential sedimentation and resuspension (Straus 1954, 1956). By these procedures practically pure fractions of orange and red chromoplasts were prepared from the same lot of carrots, the former by flotation on sucrose solution of density 1.12, the latter by flotation on the original carrot juice (approximate density 1.05). The different flotation properties reflect the lower density of the red chromoplasts compared to the orange ones. The isolation of the orange chromoplasts was greatly facilitated by their property to form compact layers on the walls of the centrifuge tubes both below and above the surface of the suspension when the chromoplasts, suspended in 30 to 35% sucrose solution, were centrifuged at high speed in an angle centrifuge. Fig. 1 shows a highly purified fraction of orange chromoplasts.

The purity of isolated, intact chromoplasts was estimated from their carotene content (see section C 2) and by staining with methylene blue. Contaminating granules, a part of which may consist of clumps of agglutinated submicroscopic particles, as well as partially disintegrated chromoplasts are stained intensely blue. Intact chromoplasts, on the other hand, are not stained by methylene blue except at their surrounding “membranes” since the pigments prevent the penetration of the dye into the “stroma.”

Highly purified chromoplasts in aqueous suspension have unusual hydrophilic properties (Straus 1954). In this state, the chromoplasts show much higher “colloidal” stability than colloidal carotene suspensions although most chromoplasts are much larger than the tiny carotene crystals in “colloidal” suspensions of carotene. It was suggested that the high phospholipid content of the stroma (see section C 2) is responsible for the

hydrophilic properties of the chromoplasts. The possibility mentioned above, of separating intact chromoplasts by "differential resuspension" from contaminating, non-resuspending material and from disintegrating chromoplasts, is probably based on these surface properties of the intact chromoplasts.

2. Chemical and enzymatic analysis of isolated chromoplasts of the carrot (Straus 1954, 1956).—The analysis of highly purified chromoplasts of carrots showed the following results. The carotene content varies between 19 and 56%. The pigment-free portion ("stroma"²) contains approximately 22% proteins and 58% ether-alcohol soluble matter of which 21% is phospholipids. The RNA-content of the protein fraction of the stroma was estimated, on the basis of ultra-violet absorption, to be 3.3%. It would be higher, 5.9%, if RNA-phosphorus determinations were taken as the basis for calculation. The stroma contains 6% ash, 0.4% ether-soluble calcium, and 0.04% iron. It was suggested that the ether-soluble calcium is present as the ether-soluble calcium salt of phosphatidic acid.

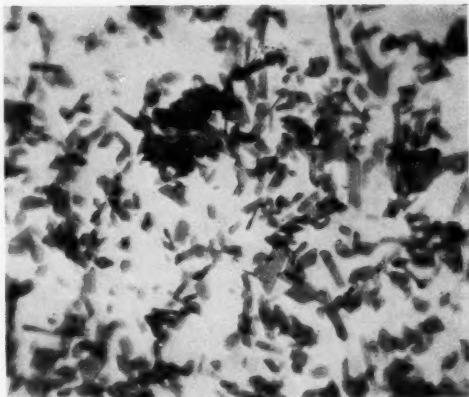


Fig. 1. Isolated chromoplasts of carrot, $\times 1000$ ³.

It will be mentioned in section C 3 that fragments of the stroma can be prepared by shaking highly purified chromoplasts, in aqueous suspension, with a little ether. It was found that these fragments are stained intensely by pyronine and that the staining is abolished by treatment with ribonuclease. This cytochemical demonstration of RNA in the stroma confirms the biochemical analysis for RNA mentioned above.

The significance of the variation of the carotene content was analysed more closely. Since red and orange chromoplasts could be isolated from the same sample of carrots, and since the red chromoplasts showed higher carotene content and greater thickness than the orange ones, it was concluded that the thick, red chromoplasts represent later stages of development than the thin, orange ones. Observations were made which suggest that the carotene content is increasing in multiples of the same unit amount, (n) equals 9.5. In 33 experiments, chromoplast fractions were obtained with an average carotene content of 19% (2 n), 30% (3 n), 37% (4 n),

³ Some of the figures were reprinted from Science 112, 745 (1950) with the permission of the American Association for the Advancement of Science.

47% (5 *n*) and 56% (6 *n*). It was suggested that this regularity might be related to the lamellar structure of the chromoplasts (see section C 3) and that each layer may contain a constant amount of carotene. No difference was found in the proportion of α -carotene to β -carotene in fractions of chromoplasts showing different concentrations of total carotene.

Exploratory experiments were made on the enzymatic properties of isolated carrot chromoplasts (Straus, unpublished). Although these experiments have not been completed, they may be reported here. Tests were made for two enzymes, lecithinase and cytochrome c oxidase. Lecithinase activity was determined by measuring the amount of choline split off from lecithin after treatment with ether as indicated by Kates (1954).

Table 1. *Specific activities of lecithinase and cytochrome oxidase in isolated chromoplasts of carrot and in chloroplasts of spinach leaves.*

	Carrot roots				Spinach leaves	
	Total Extract ¹	Isolated Chromoplasts			Total Extract	Isolated Chloroplasts
		Exp. I	Exp. II	Exp. III		
mg. Chlorophyll/mg. N ...					0.23	1.16
mg. Carotene/mg. N.....	0.12	8.2	15.4	40.1		
Lecithinase (mg. Choline/mg. N).....	0.77	4.2	6.8		0.43	0.76
Cytochrome c Oxidase (QDI-units/mg. N)	1.5	5.0		5.7	0.53	0.85

¹ average of 3 experiments.

Cytochrome oxidase activity was determined by measuring the amount of the red pigment formed from N,N-dimethyl-*p*-phenylene-diamine after addition of cytochrome c according to Straus (1956). For comparison, chloroplasts isolated from spinach leaves were also tested. Both types of plastids were purified by flotation on strong sucrose solution (see section C 1).

The figures shown in Table 1 indicate that the isolated chromoplasts of carrot contain lecithinase. This confirms the observations by Kates (1954) as to the presence of this enzyme in plastids. The experiments also suggest that the chromoplasts of carrot contain cytochrome oxidase since the specific activities were considerably higher in the isolated chromoplasts than in the original extract. However, more experiments should be made before the presence of cytochrome oxidase in the chromoplasts can be considered as proven. It should be noted that the high concentration of pigments does not permit an easy penetration of the reagents into the stroma (except at the "border fibers") where the enzymes are localized. In the case of lecithinase, the stroma could be separated from the pigments by the ether treatment. In the case of cytochrome oxidase, similar treatment

could not be applied since it would destroy the enzymatic activities. It may be mentioned that the variable proportions of carotene to nitrogen of the isolated chromoplasts (Table 1) reflect the accumulation of the pigments and the regression of the stroma (nitrogen) with age.

3. Microscopic structure of the stroma² (Straus 1943, 1950).—As was mentioned, the proportion of stroma to pigments varies greatly in the chromoplasts of carrots at different stages of their development (see section C2). Young chromoplasts with relatively high stroma and low pigment contents are therefore more favorable for this investigation than old chromoplasts.

Isolated chromoplasts sometimes show characteristics after partial, spontaneous disintegration such as fragmentation, vacuolization and striation. These permit conclusions to be made on the structure of the stroma. The following treatments were applied to remove or bleach most of the pigments



Fig. 2. Spontaneous disintegration of chromoplasts of carrot into many fiber-like fragments, $\times 1800$.



Fig. 3.



Fig. 4.



Fig. 5.

Fig. 3-5. Disintegrating chromoplasts showing parallel fibers, Fig. 3-4: $\times 1800$, Fig. 5: $\times 900$.

and to preserve the stroma. Highly purified chromoplasts, fixed by heat on a microscope slide, were treated either with weak iodine solution, with hot water, with 70% acetone, or by long enclosure in glycerol. Highly purified chromoplasts in aqueous suspension were treated with a little ether or with *n*-butanol.

a) **Fibrillar structure.**—This structure was deduced from observations showing spontaneous disintegration of isolated chromoplasts into many fiber-like fragments (Fig. 2), or parallel fibers appearing within the chromoplasts after one of the above treatments (Fig. 3–5). The observation of stripe-like vacuoles (Fig. 6) also point to the fibrillar structure of the stroma. The fiber-like nature and greater thickness of the surrounding "border fibers" can be recognized in intact as well as in partially disintegrated chromoplasts (Fig. 3, 4, 8, 11, 12).



Fig. 6. Chromoplast with stripe-like vacuole, $\times 1800$.

Whereas the above characteristics indicate a fibrillar structure of the stroma in one dimension, the occurrence of rectangular vacuoles (Fig. 7) suggests a regular structure in two dimensions. In this case two systems of parallel fibers, perpendicular to each other, would exist. Al-

though such a network structure of the stroma was seen in some experiments, not enough observations have been made. Since the microscopically visible

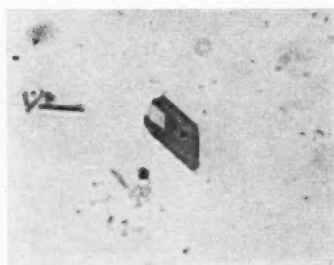


Fig. 7.

Fig. 7. Chromoplast with rectangular vacuole, $\times 1500$.



Fig. 8.

Fig. 8. Chromoplast showing split, $\times 1800$.

fibers probably contain bundles of submicroscopic fibrillae, electronmicroscopy should be applied to clarify these questions.

The splitting chromoplast shown in Fig. 8, may be related to the movements of polygonal cytoplasmic areas mentioned in section B2. The "border fibers" originally surrounding colorless cytoplasmic areas in ameboid movement, can still be recognized to extend into the narrow split (Fig. 8). The movement of these areas probably has been arrested with the formation of the pigments.

b) **Lamellar structure.**—The lamellar structure can be recognized in those chromoplasts of carrot in which segments of superimposed layers are broken out. In such chromoplasts, parallel stripes can be seen which delimit the ends of layers, and the thicker segments can be recognized by their stronger coloration (Fig. 9–11). These characteristics can be observed especially among the old, thick and red chromoplasts in which several lamellae are superimposed.

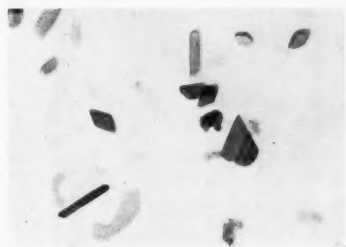


Fig. 9.



Fig. 10.

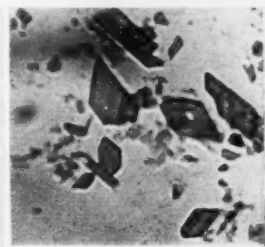


Fig. 11.

Fig. 9–11. Chromoplasts showing superimposed layers, $\times 1800$.

c) **Granular structure.**—Such a structure may be deduced from tiny vacuoles and granules appearing in disintegrating chromoplasts

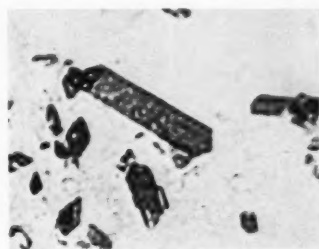


Fig. 12.

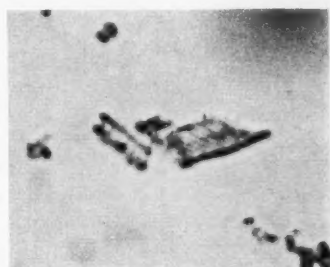


Fig. 13.

Fig. 12. Disintegrating chromoplast showing small vacuoles and granules.
Fig. 13. Part of stroma, stained with methylene blue, showing rows of tiny discs, $\times 2100$.

(Fig. 12). In one observation (Fig. 13), the parallel fibers of the stroma appeared to be composed of many superimposed discs at the limit of microscopic visibility. If this was not an artifact, it would indicate that the chromoplasts contain piles of superimposed discs, similar to the grana of chloroplasts.

In the green upper parts of some carrots, plastids intermediate between chromoplasts and chloroplasts occur. Since chloroplasts have a pronounced

granular structure, it is possible that a granular structure can be seen especially in these intermediate plastids. The granular structure of the chromoplast seen in Fig. 14, may have been accentuated by diffraction artifacts. The granular structure of most chromoplasts is probably submicroscopic and should be examined by electronmicroscopy.

4. State of the pigments (Straus 1939, 1953, 1956).—The state of carotene in the chromoplasts of carrots was compared to that in colloidal solutions and also to its adsorbed state, found, for example, on a chromatographic column of Al_2O_3 . In colloidal solutions of carotene, the degree of dispersion can decrease gradually from submicroscopic crystals to microscopically visible crystals. In a similar way, the degree of dispersion of carotene in chromoplasts may decrease gradually. This would explain why the carotene crystals can assume the shapes of the chromoplasmic stroma. However, according to Meyer (1883) and Guilliermond et al. (1935) the inverse is true: the chromoplasts take on the shapes of the carotene crystals. It may be pointed out in this connection that the filamentous and round chromoplasts which can be seen in carrot cells (see section B1) have the same orange color as the crystal-shaped bodies. This shows that there is no causal relationship between the crystalline shapes of the chromoplasts and the crystalline state of the pigments.



Fig. 14. Chromoplast showing granular and fibrillar structure, $\times 1800$.

Colloidal solutions of carotene have an absorption band in the green region of the spectrum which is not present in solutions of carotene in organic solvents (Straus 1939, Shibata 1956). This absorption band varies between 490 and 530 $m\mu$. It gradually shifts to longer wave lengths when the particle size of the small carotene crystals in "colloidal" solutions is increased experimentally. The absorption spectra of carrot juice and of isolated carrot chromoplasts resemble those of such colloidal suspensions of carotene. The spectra become almost identical if a little lecithin has been added to the colloidal carotene solution during its preparation (Straus 1939).

It was observed by Schimper as early as 1885 that the chromoplasts of carrot appear in orange and red shades. As was mentioned in sections C2 and C3, red chromoplasts are thicker and contain more pigments than the orange forms. Thus, different concentrations of the pigments are partially responsible for the different colors. In addition, the state of dispersion of the pigments, depending on the varying amounts of accompanying proteins and lipids, may also influence the shades of the orange and red chromoplasts. The pigments of orange chromoplasts of carrot probably are in close association with phospholipids thus resulting in stronger absorption of the light in the blue region of the spectrum. On the other

hand, red shades with a stronger absorption in the green region of the spectrum, may appear in old chromoplasts with the accumulation of the pigments and the regression of the stroma (proteins and phospholipids). Red shades may also appear in young chromoplasts. In this case, they probably indicate a stronger association of the pigments with proteins than with phospholipids thus decreasing the degree of dispersion of the pigments.

When the chromoplasts of carrots are treated with 70 to 90 per cent acetone, the pigments of some chromoplasts are dissolved and the stroma becomes visible (Straus 1943). Simultaneously, the pigments recrystallize on other chromoplasts in large crystals which have different shapes from those of the original chromoplasts.

D. Review of some recent investigations on plastids

A few reports of the literature which may bear on the problems of chromoplasts may be cited in this section. These reports concern the electronmicroscopic investigation of certain chromoplasts, electronmicroscopic and certain physiological observations on the development of chloroplasts, the nucleic acid content and protein synthesis of chloroplasts, certain filamentous leucoplasts, and the possible relationship between plastids, mitochondria and other lamellar systems of cells. Since the author has not been able to follow the complete botanical literature during the last years, some interesting reports may have been omitted unintentionally.

Frey-Wyssling and Kreutzer (1958) report on the electronmicroscopic investigation of the pointed and spindle-shaped chromoplasts of *Capsicum annuum* and found that they contain bundles of submicroscopic fibrillae. These investigators distinguish 3 types of chromoplasts: those with globuli, those with microscopic crystals of carotinoid pigments such as in carrot cells, and those with bundles of submicroscopic fibrillae. However, the distinction between the two last-named types does not seem to be justified. As was mentioned above (section C 3), the microscopically visible fibers in the stroma of carrot chromoplasts probably also contain bundles of submicroscopic fibrillae. It is interesting that Frey-Wyssling and Kreutzer draw a comparison between chromoplasts and virus bodies. Such a comparison has been made repeatedly by Straus (1942 b, 1943, 1953).

No full agreement about the development of chloroplasts, investigated by electronmicroscopy, seems to have been reached (compare, for example, Perner 1956, Heitz 1957, Mühlethaler and Frey-Wyssling 1959). The ideas of Mühlethaler and Frey-Wyssling may be cited as the most recent ones. According to these investigators, the chloroplasts develop from submicroscopic vesicles, 20 m μ in size. When the vesicles have grown to 1 μ diameter, invaginations of their outer membranes take place and give rise to the formation of the lamellae of the grana. In etiolated plants, a different development occurs: a "prolamellar body" is formed. As Heitz (1954, 1956), Leyon (1954), Perner (1956), and

Mühlethaler and Frey-Wyssling (1959) have found, this body shows in some plants a striking crystal-like arrangement of sub-units. After re-admission of light, the lamellae of the grana and of the stroma "grow out" from the rows of sub-units of the "crystal" in a regular fashion.

The observations reported in section C3 have led to the conclusion (Straus 1943, 1950, 1953) that the crystal shapes of the chromoplasts of carrot are due to a crystal-like structure of the stroma, rather than to the crystallization of the pigments as had been generally assumed. The "prolamellar body" of young chloroplasts is another case where a "crystal" (not consisting of pigments) has been found in plastids. According to Perner (1956), the prolamellar body (his "primary granum") contains nucleoproteins and lipids, and the sub-units are connected by fine filaments. If the prolamellar bodies of chloroplasts have a fibrillar structure, this would be analogous to the stroma of the carrot chromoplasts. It may be of interest to compare the structure of the chromoplast seen in Fig. 14 with the structure of the prolamellar bodies of chloroplasts as observed in the electronmicroscopic investigations mentioned above. Both structures seem to be almost identical. However, diffraction artifacts have probably accentuated the submicroscopic structure of the stroma of the carrot chromoplast seen in Fig. 14, and therefore only cautious interpretations are possible. It should be noted that the chromoplast seen in Fig. 14 has developed two new structures on an adjacent layer: a tetragonal rim and a diagonally extending rodlet. These "organizing" tendencies of the carrot chromoplast resemble those of the prolamellar bodies which also seem to "organize" the "growing out" of lamellae in chloroplasts. It was mentioned in section C3 that carrot chromoplasts are composed of several superimposed lamellae. If this interpretation is correct, this lamellation would be the expression of the "organizing" tendencies of a "prolamellar body" present in the stroma of the carrot chromoplasts.

It was mentioned in section B2 that xylem cells of carrot slices embedded in sucrose solution show structures in ameboid movement the shapes of which resemble those of the chromoplasts. The long and branching filaments among them had previously (Straus 1953) been compared to the long and anastomosing "mitochondria" observed in plant cells by Buvat (1946, 1947). Sorokin (1955) has observed similar, ameboid and anastomosing filaments in the cells of leaves of *Lactuca sativa*. She has found that the filaments arise under anaerobic conditions and has interpreted them as leucoplasts as did the author in the case of the carrot cells. It was pointed out (Straus 1953) that in carrot cells (xylem) the movements of these cytoplasmic areas show distinct formative tendencies. In one experiment, for example, it was observed that a colorless "crystal" was formed by a sudden closing movement of one of its surrounding "membranes" (filament) just before cyclosis had stopped definitely. It was suggested in section C3 that the splitting of the chromoplast shown in Fig. 8 is due to similar movements. The question may be raised whether these movements represent dynamic aspects of the static pictures seen in the electronmicrographs of several investigators: "crystallization" of prolamellar

bodies; "growing out" of lamellae from them; fusion of submicroscopic vesicles into lamellae as suggested by Hodge et al. (1956). As was mentioned in the Introduction, already the early botanists had observed similar dynamic processes during the development of the chromoplasts.

It is interesting to note in this connection that the cells of carrots and the stroma of carrot chromoplasts are rich in ribonucleic acid (see section C2). Nucleic acids have also been found in chloroplasts by Sisakyan and Odintsova (1956), Spiekermann (1957), and Chiba and Sugakara (1957). Accumulation and synthesis of proteins, known to depend on nucleic acids, have been demonstrated in chloroplasts by de Deken-Grenson (1954), and Sisakyan and Filippovich (1957). It may be mentioned in this context that the relatively high concentrations of ribonucleic acids and phospholipids in the stroma of the chromoplasts of carrots (section C2) call to mind the chemical composition of the "microsomes" and "endoplasmic reticulum" of animal cells where protein synthesis is known to be mainly localized. However, such a possible role for the nucleic acids of the chromoplasts in protein synthesis may be important only in the early stages of their development since the stroma regresses considerably with age. Later, they may be concerned mainly with the synthesis of enzymes functioning in the production of the pigments and lipids.

The electronmicroscopic investigations of chloroplasts have not yet led to an agreement on the question of whether there exists in plastids a structure endowed with self-duplicating properties as postulated by Strugger (1950). Brawerman and Chargaff (1960) conclude from a quantitative investigation of the formation of bleached cells at elevated temperature that there is a self-duplicating system in *Euglena*. However, de Deken-Grenson and Godts (1960) investigated the descendance of bleached cells of *Euglena* after elevation of temperature, treatment with streptomycin, and irradiation, and came to the conclusion that the effects can not be explained by the loss of particles endowed with genetic continuity.

The possible relationship of chromoplasts to mitochondria should be discussed in view of the detailed investigations of Guilliermond (1917, 1919) and his conclusions that the chromoplasts develop from rod-shaped and filamentous mitochondria. It has been the opinion of most botanists during the last 30 years that plastids and mitochondria are not related. Recently, however, Mühlethaler and Frey-Wyssling (1959) mentioned two new arguments in support of such a relationship. They pointed out that the electronmicroscopic aspects of young plastids and mitochondria are similar, and that photochemical phosphorylation, known to occur in plastids, is related to oxidative phosphorylation, known to occur in mitochondria. If further experiments would confirm the presence of cytochrome oxidase in the chromoplasts of carrots (section C2), this would also point to a relationship between plastids and mitochondria. It may be mentioned that Brown (1954) found in various plant cells colorless bodies with shapes similar to those of the chromoplasts of carrot. The

bodies reduced tetrazolium chloride, and Brown discussed the possibility that they might contain mitochondrial enzymes.

Previously, the lamellar structure of the chromoplasts of carrots had been compared to that of mitochondria, rod outer segments of the retina, and myeline sheets of nerve fibers (Straus 1942 b, 1953). Recently, these analogies in the submicroscopic structure of plastids and other lamellar systems of the cells have been discussed in detail by Sjöstrand (1959) and Fernández-Morán (1959). According to de Robertis (1956), the development of the stacked discs of the rod outer segments of the retina takes place in relation to submicroscopic filaments and vesicles containing morphogenetic materials. The comparison between carrot chromoplasts and the rod outer segments of the retina may be of special interest since both may contain the carotinoid pigments in a crystalline order near the surface of submicroscopic lamellae. The orderly arrangement of the rhodopsin molecules in the rod outer segments, investigated by Schmidt (1937) and Denton (1959), may be important for the transmission of light energy. A crystalline order of the pigment molecules may also play a role in the primary photochemical reaction of photosynthesis in the chloroplasts (Tollin, Sogo, and Calvin 1958).

Since chromoplasts are not active in photosynthesis, they have not excited the same interest as chloroplasts. However, chromoplasts have several properties which seem to make more intensive investigation worth while. It is hoped that the present report may induce other investigators to take up some of these problems.

References

- Brawerman, G., and E. Chargaff, 1960: A self-reproducing system concerned with the formation of chloroplasts in *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 37, 221.
- Brown, W. V., 1954: A preliminary study of the staining of plant cells by tetrazolium chloride. *Bull. Torrey Botanical Club* 81, 127.
- Buvat, R., 1946 a: Evolution du chondriome dans les cultures de tissus de Chicorée à café. *C. r. acad. sci. (Paris)* 222, 970.
- 1946 b: Action de l'eau sur le chondriome des cellules de la racine de Chicorée à café. *C. r. acad. sci. (Paris)* 222, 1187.
- 1947 a: Observations vitales, prolongées pendant quatorze jours, de l'action de l'eau sur les chondriosomes d'une même cellule. *C. r. acad. sci. (Paris)* 224, 359.
- 1947 b: Influence de la cyclose sur les chondriosomes des cellules de Chicorée et de Scorsonère immergées dans l'eau. *C. r. acad. sci. (Paris)* 224, 668.
- Chiba, Y., and K. Sugakara, 1957: The nucleic acid content of chloroplasts isolated from spinach and tobacco leaves. *Arch. Biochim. Biophys.* 71, 567.
- Courchet, M., 1888: Recherches sur les chromoleucites. *Ann. Sci. Nat.* VII, 7, 263.
- Deken-Grenson, M. de, 1954: Grana formation and synthesis of chloroplastic proteins induced by light in portions of etiolated leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 14, 203.
- and A. Godts, 1960: Descendance of *Euglena* cells after various bleaching treatments. *Exper. Cell Res.* 19, 376.

- Denton, E. J., 1959: The contributions of the orientated photosensitive and other molecules to the absorption of the whole retina. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B.*, 150, 78.
- Fernández-Morán, H., 1959: Fine structure of biological lamellar systems. In: *Biophysical Science—A Study Program*, edited by J. L. Oncley, F. O. Schmitt, R. C. Williams, M. D. Rosenberg, R. H. Bolt. John Wiley & Sons, Inc., New York 1959.
- Frey-Wyssling, A., and E. Kreutzer, 1958: The submicroscopic development of chromoplasts in the fruit of *Capsicum annuum*. *J. Ultrastruct. Res.* 1, 397.
- Fritsch, P., 1883: Über farbige körnige Stoffe des Zellinhalts. *Jb. wiss. Bot.* 14, 185.
- Guilliermond, A., 1917: Recherches sur l'origine des chromoplastes et le mode de formation des pigments du groupe des xanthophylles et des carotines. *C. r. acad. sci. (Paris)* 164, 232.
- 1919: Observations vitales sur le chondriome des végétaux et recherches sur l'origine des chromoplastides et le mode de formation des pigments xanthophylliens et carotiniens. *Rev. Gén. Bot.* 31, 372, 446, 532, 635.
- G. Mangenot, and L. Plantefol, 1935: *Cytologie Végétale*.
- Heitz, E., 1954: Kristallgitterstruktur des Granums junger Chloroplasten von *Chlorophytum*. *Exper. Cell Res.* 7, 606.
- 1956: Kristallgitterstruktur in den jungen Chloroplasten einer Dikotyledone. *Experientia* 12, 476.
- 1957: Die Struktur der Chondriosomen und Plastiden im Wurzelmeristem von *Zea Mais* und *Vicia Faba*. *Z. Naturforsch.* 12 b, 283.
- Hodge, A. J., J. D. McLean, and F. V. Mercer, 1956: A possible mechanism for the morphogenesis of lamellar systems in plant cells. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* 2, 597.
- Hofmeister, W., 1867: Die Lehre von der Pflanzenzelle.
- Karrer, P., and W. Straus, 1958: Eigenschaften kolloider Carotinlösungen. *Helv. Chim. Acta* 21, 1624.
- Kates, M., 1954: Lecithinase systems in sugar beet, spinach, cabbage and carrot. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 32, 571.
- Kraus, G., 1872: Die Entstehung der Farbstoffkörper in den Beeren von *Solanum pseudocapsicum*. *Jb. wiss. Bot.* 8, 156.
- Leyon, H., 1954: The structure of chloroplasts. VI. The origin of the chloroplast lamina. *Exp. Cell Res.* 7, 609.
- Meyer, A., 1883 a: Über Kristalloide der Trophoblasten und über die Chromoplasten der Angiospermen. *Bot. Ztg.* 41, 489, 505, 525.
- 1883 b: Das Chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung.
- Mohl, H. v., Über den Bau des Chlorophylls. *Bot. Ztg.* 15, 89, 105.
- Mühlethaler, K., and A. Frey-Wyssling, 1959: Entwicklung und Struktur der Proplastiden. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 6, 507.
- Perner, E. S., 1956 a: Die ontogenetische Entwicklung der Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*. I. Die Persistenz des Primärgranum und seine fragliche Kristallgitter-Struktur im Proplastid. *Z. Naturforsch.* 11 b, 560.
- 1956 b: II. Das Verhalten der Proplastiden bei der Entwicklung zu Jungchloroplasten. *Ibid.* 11 b, 567.

- Rezende-Pintó, M. C. de, 1952: Über die Genese und die Struktur der Chloroplasten bei den höheren Pflanzen. *Protoplasma* 41, 336.
- Robertis, E. de, 1956: Morphogenesis of retinal rods. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* 2, No. 4, suppl., 209.
- Sachs, J., 1862: Übersicht der Ergebnisse der neueren Untersuchungen über das Chlorophyll. *Flora, Allg. bot. Ztg.* 20, 129, 161.
- Schimper, A. F. W., 1880: Untersuchungen über die Entstehung der Stärkekörner. *Bot. Ztg.* 38, 881.
- 1885: Über die Entstehung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot. Zt.* 41, 105, 121, 137, 153, 809.
- 1885: Untersuchungen über die Chlorophyllkörner und die ihnen homologen Gebilde. *Jb. wiss. Bot.* 16, 1.
- Schmidt, W. J., 1937: Die Doppelbrechung von Karyoplasma, Zytoplasma und Metaplasma. *Protoplasma-Monographien* 11.
- Schmitz, F., 1885: Die Chromatophoren der Algen. *Verh. naturhist. Verein Bonn* 40, 1.
- Shibata, K., 1956: Absorption spectra of suspensions of carotene crystals. *Biochim. Biophys. Acta* 22, 398.
- Sisakyan, N. M., and M. S. Odintsova, 1956: Ribonucleic acid of plastids and its changes during plant development. *Biokhimiya* 21, 577.
- and I. I. Filippovich, 1957: Protein synthesis in isolated structures of the plant cell. *Biokhimiya* 22, 375.
- Sjöstrand, F. S., 1959: Fine structure of cytoplasm: the organization of membranous layers. In: *Biophysical Science—A Study Program*, edited by J. L. Oncley, F. O. Schmitt, R. C. Williams, M. D. Rosenberg, and R. H. Bolt. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Sorokin, H., 1941: The distinction between mitochondria and plastids in living epidermal cells. *Amer. J. Bot.* 28, 476.
- 1955: Experimental production of filaments and networks in cytoplasm of *Cichoriae*. *Exp. Cell Res.* 9, 510.
- Spiekermann, R., 1957: Cytochemische Untersuchungen zum Nachweis von Nucleinsäuren in Proplastiden. *Protoplasma* 48, 303.
- Strasburger, E., 1876: Studien über das Protoplasma.
- Straus, W., 1939: Über kolloidales Carotin und den natürlichen Zustand der Carotinoide. Ph. D. Thesis. Zürich.
- 1942 a: Reinigung und Analyse der Farbstoffträger aus Mohrrüben und Spinatblättern. *Helv. Chim. Acta* 25, 179.
- 1942 b: Étude des cristaux, rubans et bâtonnets rouges de la carotte. *Helv. Chim. Acta* 25, 705.
- 1943: Sur la structure des chromatophores de la carotte. *Helv. Chim. Acta* 26, 1370.
- 1950: Microscopic structure of carrot chromoplasts. *Science* 112, 745.
- 1953: Chromoplasts-development of crystalline forms, structure, state of the pigments. *Bot. Rev.* 19, 147.
- 1954: Properties of isolated carrot chromoplasts. *Exp. Cell Res.* 6, 392.
- 1956 a: Isolation of chromoplasts from carrots. *Exp. Cell Res.* 11, 289.
- 1956 b: Colorimetric determination of cytochrome c oxidase by formation of a quinonediimonium pigment from dimethyl-*p*-phenylenediamine. *Biochim. Biophys. Acta* 19, 58.

- Strugger, S., 1950: Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. *Naturwiss.* 37, 166.
- Tollin, G., P. B. Sogo, and M. Calvin, 1958: Energy transfer in ordered and unordered photochemical systems. *Ann. New York Acad. Sci.* 74, 310.
- Weier, T. E., 1942: A cytological study of the carotene in the root of *Daucus carota* under various experimental treatments. *Amer. J. Bot.* 29, 35.
- and C. R. Stocking, 1952: The chloroplast: structure, inheritance and enzymology. *Bot. Rev.* 18, 14.
- Weiss, A., 1864 und 1866: Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte des Farbstoffes in Pflanzenzellen, I und II. *S. B. Wien. Akad. Wiss.* 50, 6 and 54, 157.

Über Vitalfärbung stark saurer Zellsäfte und eine Methode zur pH-Bestimmung in vivo

Von

Helmut Kinzel und Richard Imb

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Juli 1960)

Einleitung

Bei der Vitalfärbung der Vakuolen von Pflanzenzellen mit basischen Farbstoffen kann man in der Regel eine sogenannte *Färbeschwelle* beobachten: wendet man eine nach pH-Werten abgestufte Farblösungsreihe an, dann läßt sich in allen Lösungen bis zu einer bestimmten Acidität eine Farbspeicherung in dem betreffenden Zellsaft erzielen, in allen Lösungen mit größerer Acidität bleibt jedoch die Farbspeicherung aus. Die Erscheinung ist in ihren Grundzügen schon seit langem bekannt (vgl. Drawert 1956, S. 264 ff.), wurde dann besonders von Strugger (1936, 1940, 1941) untersucht und seither von zahlreichen Forschern (z. B. Drawert 1940, Höfler 1947 a, b, Höfler und Schindler 1951 u. v. a.) immer wieder beobachtet. Eine theoretische Bearbeitung der genannten Erscheinungen (Kinzel 1954 b, 1959) ergab dann, daß der Begriff der Färbeschwelle nicht eindeutig ist. Für „leere“ Zellsäfte im Sinne von Höfler (1947 a, 1949 a), die basische Farbstoffe nur auf Grund ihrer Acidität durch eine Ionenfallenwirkung speichern, ergibt die Theorie, daß eine Farbspeicherung grundsätzlich nur dann stattfinden kann, wenn die äußere Farblösung alkalischer ist als der betreffende Zellsaft (vgl. Kinzel 1959). Die sogenannte absolute Färbeschwelle muß also dort liegen, wo in der angewandten pH-gestuften Farblösungsreihe der pH-Wert des Zellsaftes unterschritten wird. Nun beeinflusst aber der pH-Wert der Farblösung auch den Zustand des Farbstoffes selbst: unterhalb eines (für jeden Farbstoff charakteristischen) pH-Wertes liegt ein basischer Farbstoff zum überwiegenden Teil in Form von Kationen vor, für die das lebende Protoplasma praktisch undurchdringlich ist. Oberhalb dieses bestimmten pH-Wertes wandeln sich die Ionen mehr und mehr in die Moleküle der Farbbase, die lipophil sind und das lebende Protoplasma

leicht durchdringen können. Bei einer konkreten Konstellation von Zellsaft-pH und Umschlagpunkt des angewandten Farbstoffes kann es nun vorkommen, daß nach der üblichen, etwa 10 bis 20 Minuten langen Färbezeit im Zellsaft auch dann keine Farbspeicherung sichtbar wird, wenn er saurer ist als die gerade angewandte Farblösung. Dies wird dann der Fall sein, wenn der angewandte Farbstoff einen weit im Alkalischen liegenden Umschlagpunkt besitzt, so daß beim angewandten pH-Wert die Konzentration der permeierfähigen Farbbasenmoleküle sehr klein ist. In diesem Falle tritt eine Färbung erst dann ein, wenn man die Farblösung noch alkalischer macht, so daß der Anteil der Farbbasenmoleküle in ihr einen bestimmten notwendigen Wert erreicht. Näheres über diese sogenannte relative Färbeschwelle findet sich bei Kinzel (1959). Es ist nun bemerkenswert, daß diese relative Färbeschwelle von der Färbezeit abhängig sein muß: läßt man eine Lösung mit einem sehr geringen Anteil an Farbbase nur lange genug auf die betreffenden Zellen einwirken, dann wird die Farbspeicherung schließlich doch sichtbar werden, wenn sie grundsätzlich möglich ist. Die relative Färbeschwelle wird sich daher bei Verlängerung der Färbezeit in der Richtung zur absoluten hin verschieben. Diese Eigentümlichkeit war bisher nur theoretisch abgeleitet und noch kaum experimentell verifiziert worden. Eine Gelegenheit zu dieser Verifikation ergab sich bei einer Arbeit über die Vitalfärbung der stark sauren Zellsäfte von *Begonia*-Arten, in deren Rahmen umfangreiche Versuchsreihen angestellt wurden, die sowohl nach dem pH-Wert als auch nach der Färbezeit abgestuft waren. Die Versuche stellen einen Teil der Dissertationsarbeit von R. Imb dar.

Die Auswertung der Versuchsergebnisse brachte dann noch einen Beitrag zu einem weiteren wichtigen Gesichtspunkt, nämlich zum Problem der pH-Bestimmung eines Zellsaftes *in vivo*. Schon seit langem versuchen die Vitalfärber immer wieder, ihre Ergebnisse nach dieser Richtung hin auszuwerten (vgl. dazu die kritische Darstellung von Drawert 1955). In älterer Zeit glaubte man vielfach in gefärbten Zellsäften Indikator-effekte beobachten zu können, man verglich die im Mikroskop gesehenen Farbtöne mit pH-Reihen *in vitro*. Später stellte sich dann heraus, daß die basischen Farbstoffe für dieses Verfahren ungeeignet sind. Sie zeigen nämlich im Vitalfärbversuch regelmäßig metachromatische Effekte. Diese werden bei „leeren“ Zellsäften einfach durch die hohe Farbstoffkonzentration im Zellsaft bedingt und täuschen dann alkalische Reaktion vor, während sie bei „vollen“ Zellsäften durch eine chemische Bindung des Farbstoffes an zelleigene Flavone und Gerbstoffe hervorgerufen werden und dann saure Reaktion vortäuschen (vgl. dazu Kinzel 1958). In jüngerer Zeit hat nun Pilz (1959) nachgewiesen, daß auch mit den von Small (1955, 1956) empfohlenen sauren Farbstoffen eine pH-Bestimmung *in vivo* leider nicht möglich ist. So kommt also die kolorimetrische Methode, d. h. die Auswertung des Farbtönen vitalgefärbter Vakuolen, für deren pH-Bestimmung nicht in Frage.

Eine andere Möglichkeit zu einer pH-Bestimmung *in vivo* ergibt sich, wenn man die oben erwähnten Gesetzmäßigkeiten der Speicherung basischer Farbstoffe in „leeren“ Zellsäften überdenkt. Ein basischer Farbstoff

wird nur dann gespeichert, d. h. über die Außenkonzentration hinaus angereichert, wenn der betreffende Zellsaft saurer ist als die angewandte Farblösung. Man müßte also aus der Lage der Färbeschwelle in einer entsprechend fein abgestuften pH-Reihe von Farblösungen auf den pH-Wert des Zellsaftes schließen können. Das Verfahren gilt mit zwei grundsätzlichen Einschränkungen:

1. es ist nur auf „leere“ Zellsäfte anwendbar. „Volle“ Zellsäfte würden eine zu saure Reaktion vortäuschen;

2. es muß im konkreten Fall Gewißheit darüber herrschen, daß die absolute, durch die Eigenschaften des Zellsaftes bedingte Färbeschwelle beobachtet wurde und nicht die relative, durch die Dissoziationsverhältnisse des Farbstoffes bedingte.

Overbeck (1957) hat bei *Bryophyllum*-Arten mit Hilfe von Neutralrot im Bereich von pH 4,3 bis 5,7 eine recht gute Übereinstimmung zwischen der Färbeschwelle und dem pH-Wert des Preßsaftes beobachtet. Hier waren also die obengenannten beiden Fehlerquellen offensichtlich nicht wirksam. Soll nun diese Methode der pH-Bestimmung weiter ausgebaut werden, dann ist zunächst nach allgemeinen Kriterien zu suchen, die die obengenannten Fehler vermeiden helfen. Davon soll im folgenden die Rede sein.

Methodik

Es wurden Längsschnitte durch das Blattstielparenchym verschiedener *Begonia*-Arten hergestellt und in Farblösungsreihen mit gestuften pH-Werten übertragen. Die Einstellung der pH-Werte geschah durch Zusatz von Phosphatpufferlösungen nach den Angaben von Strugger (1949) bzw. Kinzel (1954a). Nur die pH-Werte unter 2, die für die Chrysoidinversuche notwendig waren, wurden durch Zusatz von reiner HCl erreicht und jeweils mit der Glaselektrode nachgemessen. Das Hauptversuchsobjekt war *Begonia hydrocotylifolia*. Orientierende Versuche mit anderen *Begonia*-Arten ergaben vergleichbare Resultate.

Ergebnisse

1. Die Prüfung auf „vollen“ oder „leeren“ Charakter des Zellsaftes

Hier handelt es sich also um das oben geforderte Kriterium zur Ausschaltung der erstgenannten Fehlerquelle. Die zuverlässigste Methode zu dieser Prüfung ist die Vitalfärbung mit Akridinorange. Höfler (1947a, 1949) hat als leere Zellsäfte diejenigen Vakuolen bezeichnet, die die Kationen des genannten Farbstoffes mit roter Fluoreszenzfarbe anreichern. Die vollen Zellsäfte hingegen speichern eine Verbindung des Farbstoffes mit zelleigenen Speicherstoffen, die grell grün fluoresziert.

Zur Interpretation der beobachteten Farbtöne vergleiche Kinzel (1958). Bezüglich der chemischen Natur der Speicherstoffe hat Bolay (1960) in ausführlichen Versuchen gezeigt, daß es sich um Substanzen aus der Klasse der Flavonoide und Gerbstoffe handelt.

Versucht man die Zellen des Blattstielparenchyms von *Begonia* mit

Akridinorange zu färben, dann stellt sich zunächst heraus, daß sie, nach den üblichen Färbezeiten von 10 bis 20 Minuten, nur in den alkalischen Farblösungen eine ziemlich schwache mattgrüne Fluoreszenz der Vakuolen zeigen. Nun war aber eine sehr intensive Farbspeicherung erwartet worden, da die Zellsäfte von *Begonia* — wie bekannt — stark sauer reagieren. Es erwies sich dann, daß eine solche intensive Farbspeicherung nach längerer Färbezeit tatsächlich auftritt. Vielleicht ist diese langsame Anfärbung dem Umstand zuzuschreiben, daß die Zellen ziemlich groß und zuweilen fast isodiametrisch gestaltet sind (vgl. Abb. 1, S. 428) und daher eine relativ kleinere Oberfläche besitzen als die zumeist untersuchten Epidermiszellen. Es könnte aber natürlich auch sein, daß das Protoplasma dieser Zellen besondere Permeabilitätseigenschaften besitzt.

Tab. 1. *Begonia hydrocotylifolia*: Akridinorangespeicherung im Zellsaft der Blattstielparenchymzellen.

(pH-gestufte Farbstofflösungsreihen 1 : 10.000.)

pH	F ä r b e z e i t											
	5	10	20	30	35	1	2	3	4	18	24	39
	M i n u t e n					S t u n d e n						
2,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3,95	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
							mg	mg	mg	mg	mg	mg
4,8	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
6,4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mo—o	mo—o	mo—o
7,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mo—o	o—ro	o—ro	o—ro
9,8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mo—o	mo—o	o—ro	o—ro	o—ro	o—ro

Zeichenerklärung: mg = mattgrün mo—o = matorange—orange

o—ro = orange—rot

Die nach der Zeit und nach dem pH-Wert gestaffelten Versuche sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Es fällt auf, daß bei kürzerer Färbezeit stets nur mattgrüne Fluoreszenz zu beobachten ist, die dann nach längeren Färbezeiten über Orange nach Rot übergeht. Sind dies nun volle oder leere Zellsäfte?

Hier muß gesagt werden, daß die Termini „volle“ und „leere“ Zellsäfte von Höfler (1947 a) bei der Arbeit mit sehr ausgeprägten Vertretern dieser beiden Typen aufgestellt wurden. Wer etwa in einem „Stufenschnitt“ durch eine Zwiebelschuppe von *Allium cepa* die nach Akridinorangegefärbung grellgrün fluoreszierende Außenepidermis mit dem rot leuchtenden Mesophyll vergleicht, der wird sofort die Berechtigung der für diesen Effekt geprägten Terminologie empfinden. Seit man weiß, daß die vollen Zellsäfte

ihre Eigenschaften der Anwesenheit bestimmter Substanzen aus der Flavon-Gerbstoffgruppe verdanken, ist es sicherlich klar, daß es alle Übergänge zwischen vollen und leeren Zellsäften geben muß, je nachdem ob diese Stoffe in größerer oder geringerer Menge vorhanden sind bzw. ob sie eine größere oder geringere Affinität zu den verwendeten Farbstoffen besitzen.

In dem geschilderten Falle des Blattstielparenchyms von *Begonia hydrocotylifolia* scheint nun eine geringe Menge solcher Speicherstoffe im Zellsaft enthalten zu sein. Die ersten eindringenden Mengen von Akridinorange werden an diese Stoffe gebunden und fluoreszieren grün. Nach weiterem Eindringen von Farbstoff wird der Speicherstoff schließlich abgesättigt sein, es wird die rote Fluoreszenzfarbe der assoziierten Akridinorange-kationen auftreten und die schwach grüne Fluoreszenz schließlich völlig überdecken (vgl. Höfler 1949 b). Allgemein kann gesagt werden, daß der leere Charakter eines Zellsaftes eindeutiger zu definieren und nachzuweisen ist als der volle. Höfler (1947 b, S. 605) hat z. B. die Schwelle der Vakuolenfärbung an der Innenepidermis von *Allium cepa* mit Akridinorange genau bestimmt. Schon die ersten in der Vakuole sichtbaren Mengen von Farbstoff (bei pH 6,68) fluoreszieren rot. Hier sind die erwähnten Speicherstoffe aus der Flavon-Gerbstoffgruppe also wirklich völlig abwesend. Nur solche Zellsäfte sind für die vitalfärberische pH-Messung durch Bestimmung der absoluten Färbeschwelle im strengen Sinne brauchbar. Sie sind allerdings bei den höheren Pflanzen relativ selten. Bei Algen scheinen sie häufiger zu sein (vgl. Höfler und Schindler 1955).

Die meisten Zellsäfte enthalten wechselnde Mengen und Arten von Gerbstoffen und Flavonen bzw. Anthocyanen, welche letztere sie natürlich für die Vitalfärbung ganz allgemein unbrauchbar machen. Die flavonhaltigen Zellsäfte geben mit Akridinorange jene charakteristische grellgrüne diffuse Fluoreszenz, die zur Aufstellung des Terminus „volle“ Zellsäfte führte. Die gerbstoffhaltigen Vakuolen geben sich bei Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen meist durch dendritenförmige oder krümelige Entmischungen zu erkennen (Bola y 1960). Bei Verwendung von Akridinorange zeigen diese Niederschläge rote Fluoreszenz. In einigen Ausnahmefällen, z. B. bei den Gerbstoffidioblasten von *Sedum maximum*, ist die Affinität der Inhaltsstoffe zu den basischen Gruppen von Farbstoffen besonders groß (Zöttl 1960, Bola y 1960). Trotzdem tritt nach Vitalfärbung keine sichtbare Ausfällung ein, die Färbung bleibt diffus. Es ist aber zu vermuten, daß in diesen Fällen die Fällung so rasch erfolgt, daß sie im submikroskopischen Größenbereich bleibt. Dem entspricht, daß solche Zellsäfte mit Akridinorange oft in einem braunroten Ton fluoreszieren, also ähnlich wie die stets rot fluoreszierenden sichtbaren Gerbstofffällungen. Diese Idioblastenvakuolen könnten infolge ihrer diffus rötlichen Fluoreszenz mit Akridinorange bei oberflächlicher Betrachtung für leere Zellsäfte gehalten werden. Solche Vakuolen sind relativ selten (vgl. die Tabelle 6 der zitierten Arbeit von Bola y). In Zweifelsfällen wird man natürlich gut daran tun, eine Gerbstoffreaktion mit Coffein oder Vanillin-Salzsäure durchzuführen. Alle gerbstoffführenden Vakuolen sind für eine vitalfärberische pH-Bestimmung unbrauchbar.

Die Höflerschen vollen Zellsäfte im engeren Sinne sind jedoch, wie erwähnt, diejenigen, die Flavonglykoside enthalten, Akridinorange zu grellgrüner diffuser Fluoreszenz speichern und mit basischen Hellfeldfarbstoffen Diffusfärbungen in den negativ metachromatischen Farbtönen zeigen (vgl. Kinzel 1958). Auch solche Zellsäfte haben ihre absolute Färbeschwelle in einer pH-Reihe bei größerer Acidität, als dem pH-Wert des Zellsaftes entspricht. Die oben besprochenen Vakuolen von *Begonia hydrocotylifolia*, auf die sich Tab. 1 bezieht, zeigen jedoch nur nach relativ kürzeren Färbezeiten eine ganz mattgrüne Fluoreszenz, die bei Verlängerung der Färbezeit bald nach Orange und Rot umschlägt. Sie enthalten offenbar Flavonoide nur in sehr geringen Mengen. Auch die von Overbeck (1957) untersuchten Zellsäfte von *Bryophyllum*-Arten verhielten sich in dieser Hinsicht ähnlich. Die Färbeschwellen für Neutralrot (l.c., S. 250—251) stimmten nichtsdestoweniger recht gut mit der Zellsaftacidität überein. Daraus ist zu schließen, daß ein geringfügiger Flavongehalt die Lage der absoluten Färbeschwelle nicht wesentlich verschiebt. Zellsäfte, die mit Akridinorange nur eine mattgrüne Fluoreszenz zeigen, welche nach längerer Färbezeit bald nach Rot umschlägt, können daher — mit einigem Vorbehalt — für die vorgeschlagene pH-Bestimmung verwendet werden. Bei der Beurteilung ist allerdings Vorsicht geboten: auch stark flavonhaltige Vakuolen, die mit Akridinorange grellgrün fluoreszieren, können nach längerer Färbezeit gelb bis orangerot werden, wobei dann allerdings meist rot fluoreszierende Entmischungstropfen ausfallen. Eine Entscheidung darüber, ob schwach flavonhaltige Zellsäfte für den besprochenen Zweck noch praktisch als leer zu betrachten sind, wird wohl nur nach einiger vitalfärberischer Erfahrung getroffen werden können.

2. Die Entscheidung über das Vorliegen einer relativen oder absoluten Färbeschwelle

Das Arbeiten mit *Begonia* bot den Vorteil, daß die Acidität des Zellsaftes und damit die Lage der absoluten Färbeschwelle einigermaßen bekannt war. Einige Angaben über pH-Bestimmungen an Preßsäften liegen in der Literatur vor: Ruhland und Wetzel (1926)¹, Rose und Hurd-Karrer (1927)¹, sowie Kinzel und Url (1954) fanden pH-Werte zwischen 1,2 und 2,0. Mindestens bei der gleichen Acidität der angewandten Farblösung muß also die absolute Färbeschwelle liegen. Vitalfärbeversuche mit Neutralrot zeigten aber, daß nur bis zu einem pH-Wert des Farbbades von 3,95 eine Speicherung in den Vakuolen eintrat. Das legt schon die Vermutung nahe, daß hier eine relative Färbeschwelle vorliegt: Es sind bei geringeren pH-Werten zu wenig permeierfähige Farbbasenmoleküle des Neutralrots vorhanden, um nach einer für die Zellen erträglichen Färbezeit eine Farbspeicherung zu ergeben, die grundsätzlich nach unendlich langer Färbezeit möglich sein müßte. Ein exaktes Kriterium für das Vorliegen einer relativen Färbeschwelle ist die Abhängigkeit von der Färbezeit. Wenn nämlich bei einem bestimmten pH-Wert in der Farblösung zu wenig Farb-

¹ Zitiert nach Drawert (1955).

basenmoleküle vorhanden sind, um nach einer gegebenen Zeit eine sichtbare Anreicherung des Farbstoffes hervorzurufen, dann kann nach einer längeren Zeit, nachdem mehr Farbbasenmoleküle das Plasma passiert haben, die Anfärbung doch noch sichtbar werden. Die Neutralrotversuche bei *Begonia* zeigten diese Abhängigkeit sehr schön: Nach 5 Minuten langem Aufenthalt in Neutralrotlösungen 1 : 10.000 zeigten sich die Zellsäfte nur bei den pH-Stufen 9,8 und 7,5 gefärbt, nach 10 Minuten darüber hinaus noch in der pH-Stufe 6,4, nach 30 Minuten noch in der pH-Stufe 4,8, nach 5 Stunden

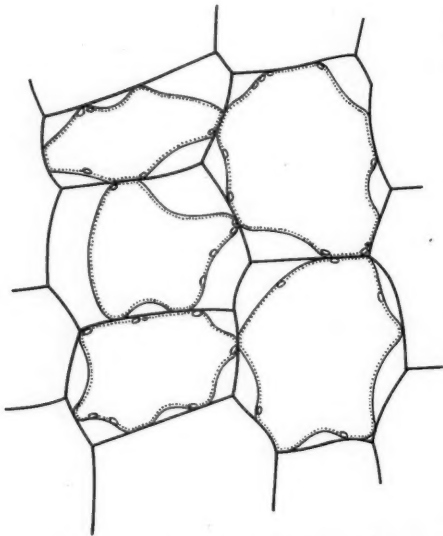


Abb. 1. Zellen aus dem Blattstielparenchym von *Begonia hydrocotylifolia*. Plasmolyse in 1 mol Traubenzucker nach halbstündiger Vorbehandlung mit $n/10$ HCl (halbschematisch).

auch in der Stufe 3,95. Weiter ins saure Gebiet ließ sich die Färbeschwelle auch nach 48stündigem Aufenthalt in der Farblösung nicht verschieben. Doch wird bei so langen Färbezeiten, besonders in den stärker sauren pH-Stufen, wohl schon eine Schädigung der Zellen eintreten. Theoretisch müßte nach unendlich langer Färbezeit die absolute Färbeschwelle erreicht werden, also etwa pH 1,2 bis 2,0. Aus den angeführten Beobachtungen ergibt sich, daß die absolute Färbeschwelle so stark saurer Zellsäfte mit Hilfe von Neutralrot nicht bestimmt werden kann. Es war daher notwendig, einen anderen basischen Farbstoff heranzuziehen, der auch im pH-Bereich um 2,0 noch eine genügende Menge permeierfähiger Farbbasenmoleküle besitzt. Als solcher bot sich das Chrysoidin an. Der Umschlagsbereich vom Molekül zum Ion dürfte bei

diesem Farbstoff (nach Angaben von Drawert 1940) um pH 5 liegen. Wie erwartet, wurde das Chryoidin schon aus der sauersten Stufe der nach den Struggerschen Tabellen hergestellten Pufferreihe (pH 2,04) in den *Begonia*-Zellsäften gespeichert. Es war daher notwendig, noch stärker saure Stufen anzuwenden. Zu diesem Zwecke wurden Chrysoidinlösungen durch Zusatz reiner HCl auf pH-Werte zwischen 1 und 2 gebracht, die mit der Glaselektrode gemessen wurden. Verwendet wurde eine Reihe mit den pH-Werten 1,95, 1,65, 1,45, 1,25, 1,05 und 0,85. Versuche mit so starken Aciditäten waren freilich insofern bedenklich, als dabei Schädigungen des Protoplasmas zu vermuten waren. Kontrollversuche zeigten aber erstaunlicherweise, daß die untersuchten Blattstielparenchymzellen bis zu 30 Minuten Aufenthalt in 0,1 n HCl (pH 1) ertrugen, ohne daß bei

nachfolgender Plasmolyse in 1 mol Traubenzucker auffällige Alterationen erkennbar waren (vgl. Abb. 1). Scheinbar ist das Protoplasma der *Begonia*-Zellen spezifisch säureresistent oder durch besonders dichte Hautschichten abgeschirmt.

Die Versuche mit der oben angeführten Farblösungsreihe ergaben folgendes: Nach 5 Minuten langer Einwirkung auf die Schnitte wurde der Farbstoff aus den Lösungen pH 1,95 und 1,65 gespeichert, nach 10 Minuten auch aus der Lösung 1,45 und zum Teil auch aus der Lösung 1,25. Wurde die Einwirkungszeit auf 15 Minuten ausgedehnt, dann fand merkwürdigerweise aus der Lösung 1,25 keine Speicherung mehr statt. Vielleicht war hier doch schon eine, morphologisch noch nicht erkennbare, leichte Schädigung der Zellen eingetreten. Jedenfalls zeigte sich, daß bei Chrysoidin bereits nach kurzer Zeit ein Schwellenwert erreicht wird, der mit dem vermuteten Zellsaft-pH, wie er aus den Messungen an Preßsäften hervorgeht, recht gut übereinstimmt. Eine leichte Zeitabhängigkeit ist wohl auch hier noch bestehen geblieben. Ein gewisser Mindestzeitraum von etwa 10 bis 15 Minuten wird eben auch im optimalen Fall für die Diffusion des Farbstoffes in den Zellsaft notwendig sein. Es ist aber kaum daran zu zweifeln, daß hier tatsächlich die absolute Färbeschwelle des untersuchten Zellsaftes bestimmt wurde.

In der Folge wurde versucht, die Zeitabhängigkeit der Schwellenwerte für verschiedene Farbstoffe in Kurvenform darzustellen. Um den Anschluß an die tabellarische Darstellung (Tab. 1) herzustellen, wurde zunächst eine Kurve für das Akridinorange gezeichnet, der eine zweite Kurve für den verwandten Farbstoff Coriphosphin beigelegt wurde (Abb. 2). Die Kurve gibt, wie ein Vergleich mit der Tab. 1 zeigt, die Schwellenwerte für den Eintritt der Grünfluoreszenz wieder. Im Bereich unterhalb der Kurve sind die Zellsäfte gefärbt, im Bereich oberhalb derselben ungefärbt. Die Abb. 3 bringt nun ähnliche Kurven für eine Reihe von Hellfeldfarbstoffen. Jede Kurve resul-

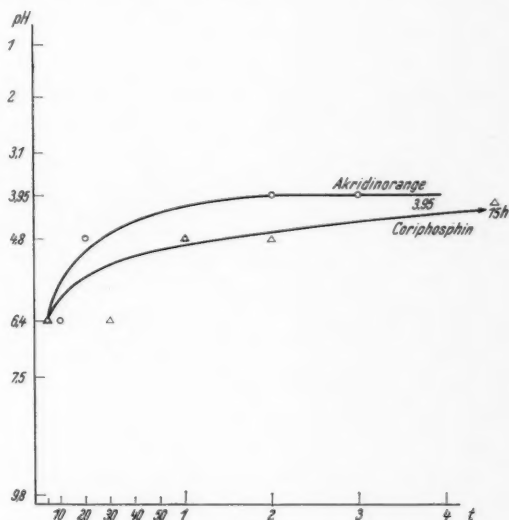


Abb. 2. Blattstielparenchym von *Begonia*: Abhängigkeit der Färbeschwelle von der Färbezeit bei Akridinorange und Coriphosphin. Abszisse: Färbezeit in Stunden. Ordinate: pH-Wert der Farblösung.

tiert aus einer großen Anzahl von Einzelversuchen, die nach den pH-Werten und nach der Färbezeit gestaffelt wurden. Nur mit Chrysoidin konnte die rasch sich einstellende absolute Färbeschwelle gemessen werden. Mit allen anderen Farbstoffen, die einen höher in der pH-Skala liegenden Umschlagspunkt besitzen, erhält man relative Färbeschwellen, die sich innerhalb langer Zeiträume zu immer saureren Werten verschieben. So färbt z. B. Auramin nach 5 bis 10 Minuten nur aus den Lösungen pH 9,8 und 7,5, nach 15 bis 20 Minuten auch aus der Lösung pH 6,4, nach 30 bis 60 Minuten auch

bei pH 4,8. In einem Versuch wurde die Färbezeit auf 17 Stunden ausgedehnt; nach dieser Zeit war auch aus der Lösung pH 3,95 Farbspeicherung eingetreten. Auch bei Vesuvin müßte theoretisch nach langer Zeit eine weitere Verschiebung der Schwelle eintreten.

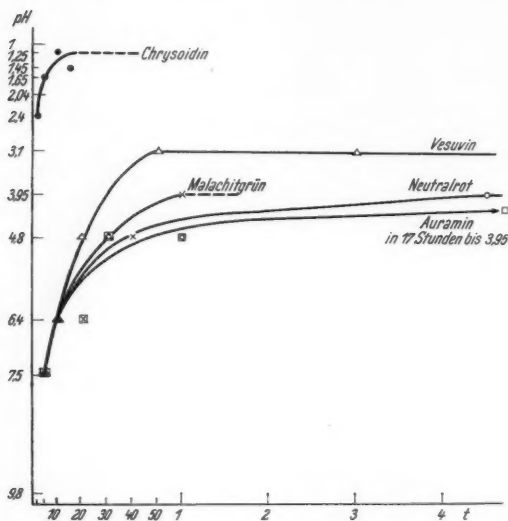


Abb. 3. Blattstielparenchym von *Begonia*: Abhängigkeit der Färbeschwelle von der Färbezeit bei einigen Hellfeldfarbstoffen. Abszisse: Färbezeit in Stunden, Ordinate: pH-Wert der Farblösung.

3. Zur Methodik einer pH-Bestimmung in vivo

An Hand des vorstehend Besprochenen lassen sich nun einige allgemeine Aussagen über die Grenzen der vorgeschlagenen Methode zur pH-Bestimmung in vivo machen. Die Entscheidung darüber, ob ein Zellsaft als voll oder leer zu bezeichnen ist, dürfte auf

Grund der Angaben des Kapitels 1 unschwer durchzuführen sein. Nur leere, gerbstoff- und flavonfreie Zellsäfte sind in strengem Sinne für die Methode verwendbar. Mit gewissem Vorbehalt sind auch noch schwach flavonhaltige, mit Akridinorange mattgrün fluoreszierende Vakuolen brauchbar.

Die Entscheidung darüber, ob eine absolute oder eine relative Färbeschwelle vorliegt, könnte an Hand der Abhängigkeit von der Färbezeit getroffen werden (Kapitel 2). Besser ist es jedoch, wenn die Dissoziationsverhältnisse des verwendeten Farbstoffes bekannt sind. Neutralrot z. B. hat seine Halbwertsstufe, bei der die Konzentration an Kationen und Farbbasenmolekülen gleich groß ist, bei pH 7,4 (Bartels 1956). In den Versuchen von Overbeck (1957) liefert die Bestimmung der Färbeschwellen nach 1 Stunde Färbezeit bis hinunter zu pH 4,3 Werte, die mit den pH-Bestimmungen an Preßsäften übereinstimmen. Die Konzen-

tration der undissoziierten Farbbasenmoleküle bei dieser Acidität (etwa 0,1% des Gesamtfarbstoffes) genügt also, um bei einer Gesamtkonzentration des Farbstoffes von 1 : 10.000 und nach 1 Stunde Färbezeit die absoluten Färbeschwelle zu liefern. Bei den viel stärker sauren Zellsäften von *Begonia* hingegen läßt sich die Färbeschwelle nicht unter 3,95 hinuntersetzen. In diesem Bereich zeigt Neutralrot also bereits die relative Färbeschwelle und ist zur pH-Bestimmung unbrauchbar. Chrysoidin (Halbwertsstufe etwa bei pH 5) gibt noch bei pH 1,25 bis 1,45 absolute Schwellen. Neutralrot ist also beim pH 4,3, bei dem es nach üblicher Färbezeit noch eine absolute Schwelle liefert, etwa 3 pH-Stufen von seiner Halbwertsstufe entfernt. Bei Chrysoidin beträgt der analoge Abstand (von pH 1,25 zu pH 5) fast 4 Stufen. Man wird also sagen können, daß ein basischer Farbstoff im Hinblick auf die Bestimmung der absoluten Färbeschwelle eine Grenze nach dem sauren Bereich zu hat, die etwa 3 bis 3,5-pH-Stufen unter seiner Halbwertsstufe liegt.

Es gibt aber auch eine Grenze nach der anderen Richtung: Voraussetzung für die Speicherung eines Farbstoffes nach dem Prinzip der Ionenfalle ist es, daß der Farbstoff im Zellsaft ionisiert wird. Dazu muß der Zellsaft einen pH-Wert besitzen, der unter der Halbwertsstufe des Farbstoffes liegt. In Overbecks Versuchen (l. c., S. 253) speicherten die Zellsäfte von *Bryophyllum* das Chrysoidin nur morgens, wenn der pH-Wert 4,4 betrug; nicht aber nachmittags beim pH-Wert 5,7. Der letztere pH-Wert liegt ja schon über der Halbwertsstufe des Chrysoidin (pH 5). Der Farbstoff wird daher im Zellsaft nicht mehr ionisiert und nicht mehr gespeichert.

In den der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Versuchen des zweitgenannten Verfassers zeigte das Rhodamin B ein interessantes Verhalten. Der Farbstoff wird im allgemeinen von leeren Zellsäften nicht gespeichert. Seine Halbwertsstufe liegt ja etwa zwischen pH 1 und 2 (vgl. Drawert 1959). Er liegt daher im pH-Bereich über 2 — in dem auch die Acidität der meisten Zellsäfte liegt — als ungeladenes Molekül vor und ist daher der Ionenfallenwirkung nicht zugänglich. Nur volle Zellsäfte speichern ihn durch chemische Bindung. Daher ist das Rhodamin B auch zur Unterscheidung von vollen und leeren Zellsäften empfohlen worden (vgl. Höfler und Schindler 1955). Die Zellsäfte des *Begonia*-Blattstielparenchyms speichern aber Rhodamin B aus Lösungen 1 : 1000 in destilliertem Wasser sehr kräftig, obwohl sie gegenüber Akridinorange nur den Eindruck von ziemlich „schwach vollen“ Zellsäften erwecken. Hierbei muß man aber bedenken, daß der pH-Wert von *Begonia*-Zellsaft bis auf 1,2 sinken kann, d. h. unter die Halbwertsstufe von Rhodamin B. Diese extrem sauren Zellsäfte können also wohl auch gegenüber Rhodamin B als Ionenfalle wirken und in diesem Ausnahmefall ist daher das Rhodamin B zur Unterscheidung von vollen und leeren Zellsäften nicht brauchbar.

Wo liegt nun die oben erwähnte zweite Grenze für die Verwendung eines basischen Farbstoffes zur pH-Bestimmung? Der Zellsaft muß saurer sein als der Halbwertsstufe des Farbstoffes entspricht. Der Farbstoff sollte im Zellsaft mindestens zu 90% ionisiert werden. Dies ist dann der Fall, wenn der pH-Wert um 1 Stufe niedriger ist als die Halbwertsstufe, bei

Neutralrot also bei pH 6,4. Die gesuchte zweite Grenze liegt also 1 pH-Stufe unter der Halbwertsstufe des betreffenden Farbstoffes (vgl. dazu auch die Überlegungen bei Kinzel 1954 b, die hier nicht nochmals entwickelt werden können). Aus den hier und weiter oben getroffenen Feststellungen ergibt sich, daß die Brauchbarkeit eines basischen Farbstoffes für die vorgeschlagene Methode auf einen pH-Bereich beschränkt ist, der 1 Stufe unter der Halbwertsstufe beginnt und etwa 3 Stufen unter der Halbwertsstufe endet. Für das Neutralrot liegt dieser Bereich also zwischen pH 6,4 und 4,4, für das Chrysoidin zwischen pH 4,0 und 2,0 (eventuell auch etwas darunter)¹.

Für die Lücke zwischen diesen beiden Bereichen müßte noch ein anderer Farbstoff gefunden werden. Vielleicht ist das Vesuvin hier brauchbar (vgl. Abb. 3).

Wie soll nun die vorgeschlagene Methode praktisch durchgeführt werden? Hat sich ein Zellsafttyp als leer oder nahezu leer erwiesen, dann sind möglichst gleichartige Schnitte, die die betreffenden Zellen enthalten, in eine Farblösungsreihe mit eng gestaffelten pH-Werten einzubringen². Nach geeigneter Einwirkungszeit (in der Nähe des Umschlagpunktes des angewandten Farbstoffes etwa 10 bis 15 Minuten, im stärker sauren Bereich möglichst bis zu 1 Stunde) wird die Lage der Färbeschwelle festgestellt. Die Untersuchung der Schnitte sollte hierbei nicht, wie sonst in der Vitalfärbung üblich, in einer farblosen Pufferlösung durchgeführt werden, sondern in der verwendeten Farblösung selbst, damit das sich einstellende Speichergleichgewicht aufrecht bleibt. Farblösungen der üblichen Konzentration 1:10.000 erscheinen ja in der dünnen Schicht zwischen Objektträger und Deckglas praktisch ungefärbt und stören die Beobachtung nicht. Die Schnitte sollten ferner nicht zu lange unter dem Deckglas liegenbleiben, da schon nach etwa 15 bis 20 Minuten durch den Sauerstoffmangel der sogenannte Asphyxie-Effekt aufzutreten beginnt, durch den der Farbstoff aus dem Zellsaft in die Zellwand verlagert wird (vgl. Strügger 1936, 1949). Liegt die so gefundene Schwelle im oben angegebenen Anwen-

¹ Die oben erhaltenen Schwellenwerte von 1,45 und 1,25 liegen also schon an der äußersten Grenze der Brauchbarkeit des Chrysoidins. Es wäre erwünscht, die Versuche mit einem Farbstoff von noch tieferer Halbwertsstufe zu wiederholen, z. B. mit Methylviolett (Halbwertsstufe um pH 2,5, brauchbar also von pH 1,5 abwärts).

² Es muß erwähnt werden, daß für die Pufferung der Farblösungsreihen nur Phosphatpuffer in Frage kommen. Die gerade im schwach sauren Bereich so günstig erscheinenden Acetat-, Citrat- und Phthalatpuffer kommen für den angegebenen Zweck leider nicht in Frage, da die in den Gemischen stets enthaltenen Anteile der freien Säuren in den Zellsaft zu permeieren und dessen pH-Wert zu ändern vermögen, auch schädigen sie das Protoplasma. Die Phosphatgemische zeigen zwischen pH 5 und pH 8 gute Pufferwirkung. Ist man genötigt, noch weiter in den sauren Bereich zu gehen, dann verlieren die Phosphatgemische ihre Pufferwirkung. Für den wichtigen Bereich zwischen pH 4 und pH 5 gibt es zur Zeit leider kein zellphysiologisch brauchbares Gemisch mit guter Pufferwirkung. So ist man in diesem Bereich darauf angewiesen, die Aciditäten der angewandten Lösungen häufig potentiometrisch zu überprüfen.

dungsbereich des betreffenden Farbstoffes (z. B. bei Neutralrot zwischen pH 4,4 und 6,4), dann kann sie als absolute Schwelle betrachtet werden. Im Zweifelsfalle wird man die Färbezeit noch etwas verlängern und prüfen, ob etwa in der nächst saureren Stufe auch noch Farbspeicherung eintritt. Der pH-Wert der sauersten Farblösung, aus der noch Farbspeicherung eingetreten ist, liegt natürlich etwas höher als der pH des Zellsaftes. Der pH-Wert der ersten Stufe, in der keine Färbung mehr auftritt, darf bei einem völlig leeren Zellsaft in erster Näherung mit dessen pH-Wert gleichgesetzt werden.

Wie groß ist der Fehler, der dabei auftreten kann? Wir haben auf Grund der bei K i n z e l (1954 b, S. 56) angegebenen Formel die Möglichkeit,

Tab. 2. *Maximale Speicherungsgrade, die das Neutralrot (Halbwertsstufe pH 7,4) in einem leeren Zellsaft mit dem pH-Wert 5 aus Farblösungen verschiedener pH-Werte erreichen kann.*

(Speicherungsgrad = Konzentration des Farbstoffes im Zellsaft dividiert durch die Konzentration des Farbstoffes in der angewandten Farblösung.)

pH der Farblösung	Speicherungsgrad
5,0	1,00
5,1	1,26
5,2	1,58
5,3	1,99
5,4	2,50
5,5	3,15
5,6	3,95
5,7	4,95
5,8	6,18
5,9	7,75
6,0	9,66

die theoretisch zu erwartenden Speicherungsgrade in Abhängigkeit vom pH-Wert der Farblösung zu errechnen. Die Tab. 2 gibt die erhaltenen Werte für einen Zellsaft mit dem pH-Wert 5 gegenüber Neutralrot. Ist der Außen-pH gleich dem Innen-pH (= 5), dann tritt natürlich keine Anreicherung im Zellsaft ein. Liegt der Außen-pH um eine Einheit höher (pH 6), dann tritt in den Vakuolen eine Anreicherung des Farbstoffes auf das 9,66fache der Außenkonzentration ein. Dazwischen liegen die angegebenen Werte. Die Größe des möglichen Fehlers hängt nun davon ab, wie groß die Farbstoffkonzentration im Zellsaft sein muß, um mikroskopisch sichtbar zu werden. Hierbei wird natürlich die Dicke der Zellen eine Rolle spielen. Es kann vorläufig nur grob geschätzt werden, daß bei sehr dünnen Zellen (z. B. von Epidermen) aus der üblichen Lösung 1 : 10.000 eine Anreicherung auf das 10fache nötig sein dürfte. Bei dickeren Zellen, z. B. aus Parenchyemen, wird wohl schon Anreicherung auf das 2- bis 3fache sichtbar werden, d. h. daß im ersten Fall die Lösung, aus der heraus die erste Anfärbung sichtbar wird, um etwa eine pH-Einheit alkalischer ist als der Zellsaft, im zweiten Fall um 0,5 bis 0,5 pH-Einheiten. Setzt man den pH-Wert der ersten nicht färbenden Lösung gleich dem Zellsaft-pH, dann ergibt sich, je nach der

Feinheit der Abstufung der Reihe, ein Fehler von einigen Zehntel pH-Stufen. Dieser zunächst recht große Fehler läßt sich aber noch bedeutend vermindern. Am aussichtsreichsten scheint hierfür eine mikrophotometrische Untersuchung der Schnitte zu sein. Es ist mit modernen Methoden möglich, die Innenkonzentration an Farbstoff exakt zu messen (vgl. Bartels 1954, Bancher und Hölzl 1960). Da die Außenkonzentration ja bekannt ist, kann man dann an Hand der Tab. 2 oder mit Hilfe der erwähnten Formel auf den wahren Schwellenwert und damit auf den wahren pH-Wert des Zellsaftes zurückrechnen³.

In den Versuchen von Overbeck (1957) findet die erste Anfärbung mit Neutralrot gelegentlich schon aus einer Lösung statt, die ein klein wenig saurer ist als der Preßsaft. Dies dürfte damit zusammenhängen, daß der Zellsaft der untersuchten Zellen — wie die Akridinorangeversuche belegen — leicht flavonhaltig war. Dadurch wird die Färbeschwelle etwas zum sauren Bereich verschoben. Die Verschiebung ist bei geringem Flavongehalt durchaus tragbar. Die bei Kinzel (1959, S. 258 ff.) angestellten Überlegungen ergeben, daß dann, wenn im Zellsaft 90% des Farbstoffes an Inhaltsstoffe gebunden und nur 10% frei sind, die Verschiebung der Färbeschwelle eine ganze pH-Einheit ausmacht. So kann man bei geringem Flavongehalt mit Verschiebungen von einigen Zehntel pH-Einheiten rechnen. Man wird also auch hier noch Näherungswerte für den Zellsaft-pH erwarten dürfen.

Es ist hier zu erwähnen, daß es für die vorgeschlagene Methode nicht empfehlenswert ist, die Färbeschwelle mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen zu bestimmen. Die Fluoreszenz im Zellsaft ist ja schon bei äußerst geringen Farbstoffkonzentrationen sichtbar und es dürfte schwerfallen, den Punkt in der pH-Skala zu fixieren, an dem die Innenkonzentration größer wird als die Außenkonzentration.

Es wird vielleicht notwendig sein, die Konkurrenz bezüglich der Farbspeicherung zu berücksichtigen, die verschiedene Zellen oder Zellteile gelegentlich gegeneinander ausüben. Eine Konkurrenz des Plasmas gegenüber dem Zellsaft kommt hier kaum in Frage, wohl aber eine solche der Zellwand, die ja im schwach sauren Bereich die basischen Farbstoffe kräftig speichert. Meist läßt die Membranfärbung stark nach, wenn die Vakuolenfärbung beginnt (vgl. Strugger 1936, 1940, 1949, Höfler 1947 a, b, 1949, Drawert 1956; bezüglich quantitativer Messungen siehe Bartels 1954, Bartels und Schwantes 1955, 1957). Man hat daher die Färbeschwelle der Vakuole gelegentlich auch als Umschlagspunkt von der Membranfärbung zur Vakuolenfärbung bezeichnet. Vielleicht wäre die Schwelle der Vakuolenfärbung exakter zu fassen, wenn man die Membranfärbung unterdrücken könnte. Zu diesem Zwecke wäre etwa ein Zusatz eines

³ Es sei erwähnt, daß in der Arbeit Kinzel 1954 b noch mit der alten Basendissoziationskonstante K_b gerechnet wurde, die für die Reaktion gilt: $\text{Farbbase} \rightleftharpoons \text{Farbkation} + \text{OH}^-$. Im neueren physikochemischen Schrifttum findet sich stets die Brönstedtsche Dissoziationskonstante K_a , abgeleitet aus der richtigeren Reaktionsgleichung $\text{Farbkation} \rightleftharpoons \text{Farbbase} + \text{H}^+$. Die Umrechnung ist leicht: Will man eine der beiden Konstanten erhalten, so hat man nur das Ionenprodukt des Wassers (10^{-14}) durch die andere Konstante zu dividieren.

Salzes, z. B. CaCl_2 , zur Farblösung vorzuschlagen (vgl. K i n z e l 1953, 1955). Vielleicht genügte es auch, den üblichen m/150 Puffer auf m/15 Puffer zu verstärken. Bei Geweben, in denen Zellsäfte von stark verschiedenem pH-Wert oder volle und leere Zellsäfte nebeneinander vorkommen, werden die Schwellenwerte der schwächer speichernden Zellen, vor allem soweit sie zu stärker speichernden Zellen unmittelbar benachbart sind, aus Konkurrenzgründen unsicher werden. In solchen Fällen werden die sauersten Zellen eines Gewebes am besten meßbar sein.

Schließlich sei noch der Einfluß der Pufferkapazität des Zellsaftes erwähnt. Die eindringende Farbbase hat die Tendenz, den pH-Wert des Zellsaftes etwas alkalischer zu machen. Die pH-Verschiebung spielt bei Zellsäften, die viel Säure enthalten, wie zum Beispiel bei *Begonia* oder *Bryophyllum*, praktisch keine Rolle. Bei der großen Masse der Zellsäfte, die eine schwach saure Reaktion von pH 5 bis 6 besitzen, muß man bei stärkerer Farbspeicherung schon mit einer gewissen pH-Verschiebung rechnen. Man wird daher trachten, schon die allererste, schwache Anfärbung zu erfassen. Wie ist es nun bei den Ausnahmefällen, bei denen ein neutraler oder schwach alkalischer Zellsaft festgestellt wurde (vgl. die Tabelle bei D r a w e r t 1955, S. 637 ff.)? Nach den Angaben der vorliegenden Arbeit sollte man meinen, daß man in solchen Fällen mit einem Farbstoff von geeignetem Umschlagsbereich auch hier die Schwellenwerte und damit den Zellsaft-pH bestimmen könnte. So müßte z. B. das Nilblau, dessen vermutliche Halbwertsstufe um pH 9 liegen dürfte, zwischen pH 6 und 8 brauchbar sein. Nun muß man aber wohl unterscheiden zwischen einer neutralen Lösung, deren pH-Wert z. B. durch einen Phosphatpuffer stabilisiert ist und einer Lösung, die deswegen neutral ist, weil sie überhaupt keine Elektrolyte enthält. Bei einem Zellsaft könnte Neutralität z. B. dadurch bedingt sein, daß als osmotisch wirksame Substanzen nur Zucker und keine Säuren bzw. deren Salze enthalten sind. In einem solchen ungepufferten Zellsaft werden schon die ersten eindringenden Spuren von Farbbase den ursprünglichen pH-Wert untragbar weit verschieben, so daß nicht nur die pH-Bestimmung unmöglich wird, sondern unter Umständen überhaupt keine sichtbare Farbspeicherung zustande kommt (vgl. K i n z e l 1954 b, S. 65 ff.). Tatsächlich sind ja Fälle von Vakuolen bekannt geworden, in denen keine Speicherung basischer Farbstoffe zu erzielen ist.

So viel über die Grenzen und Fehlerquellen der vorgeschlagenen Methode. Bei Kenntnis und Beachtung derselben dürfte das Arbeiten mit dem Verfahren aussichtsreich sein, stellt es doch vorläufig die einzige Möglichkeit dar, den pH-Wert von lebenden Zellen, bei weiterem Ausbau des Verfahrens vielleicht sogar von individuellen lebenden Zellen, mit einiger Sicherheit zu bestimmen.

Zusammenfassung

1. Es werden Vitalfärberversuche an Zellsäften des Blattstielparenchyms von *Begonia hydrocotylifolia* beschrieben. Die Vakuolen sind leicht „voll“ (wohl etwas flavonhaltig) und dabei stark sauer.

2. Im pH-gestuftten Reihenversuch ist mit einer Anzahl von basischen

Farbstoffen eine Anfärbung der Zellsäfte nur bis zu pH 5,95 bzw. 5,1 (Vesuvium) zu erzielen. Auf Grund der starken Abhängigkeit von der Färbezeit ist zu schließen, daß es sich dabei um „relative Färbeschwelle“ im Sinne von Kinzel (1959) handelt, die durch den Dissoziationszustand des betreffenden Farbstoffes bedingt werden.

Nur mit Chrysoidin tritt eine Anfärbung auch aus Lösungen bis zu pH 1,45 herunter ein. Die rasche Einstellung des Schwellenwertes und die gute Übereinstimmung mit den an *Begonia*-Preßsäften gemessenen pH-Werten zeigen an, daß es sich hier um eine „absolute Färbeschwelle“ handelt. Aus Lösungen, deren Acidität größer ist als die des Zellsaftes, ist ja mit basischen Farbstoffen grundsätzlich keine Anfärbung mehr erzielbar.

3. Es wird die Möglichkeit erwogen, durch die Bestimmung der absoluten Färbeschwelle eines leeren Zellsaftes dessen pH-Wert *in vivo* zu ermitteln. Dazu muß einerseits festgestellt werden, ob der Zellsaft wirklich „leer“ im Sinne von Höfler 1947 a (oder doch nahezu „leer“) ist, andererseits muß die Möglichkeit bestehen, sicher zwischen einer absoluten und einer relativen Färbeschwelle zu unterscheiden. Die notwendigen Kriterien für diese Entscheidungen sowie einige methodische Hinweise für das vorgeschlagene Verfahren werden mitgeteilt.

Auf Grund der Versuchsergebnisse sowie der angeführten Überlegungen kann geschlossen werden, daß der pH-Wert der Zellsäfte im Blattstielparenchym von *Begonia hydrocotylifolia* etwa 1,5—1,4 beträgt.

Literatur

- Bancher, E., und J. Hölzl, 1960: Mikrophotometrische Untersuchungen zur Neutralrotspeicherung in den Vakuolen der Innenepidermis von *Allium cepa*. Protoplasma 52, 51.
- Bartels, P., 1954: Quantitative mikrospektroskopische Untersuchung der Speicherungs- und Permeabilitätsverhältnisse akridinorangegefärbter Zellen. Planta 44, 541.
- 1956: Spektralphotometrische Untersuchungen am Neutralrot (I). Ztschr. physik. Chem. N. F. 9, 74.
- und H.-O. Schwantes, 1955: Quantitative mikrospektrographische Messungen zur Aufnahme von Thionin durch lebende Zellen von *Allium cepa*. Z. Naturf. 10 b, 712.
- — 1957: Mikrospektrographische Messungen zur Aufnahme und Speicherung von Neutralrot durch lebende Zellen von *Allium cepa*. Planta 50, 1.
- Bolay, E., 1960: Die Vitalfärbung voller Zellsäfte und ihre cytochemische Interpretation. S. B. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl. Abt. I., Bd. 169, S. 269.
- Drawert, H., 1959: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. I. Versuche mit Rhodaminen. Planta 29, 576.
- 1940: Zur Frage der Stoffaufnahme. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 154, 159.
- 1955: Der pH-Wert des Zellsaftes. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie (Hrsg. W. Ruhland), Bd. I, S. 627.
- 1956: Die Aufnahme der Farbstoffe. Vitalfärbung. Ebenda Bd. II, S. 252.
- Höfler, K., 1947 a: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmaspermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie 2, 15.

- Höfler, K., 1947 b: Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. S. B. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl. Abt. I, Bd. 156, S. 585.
- 1949 a: Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. *Biologia generalis* 19, 90.
- 1949 b: Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. *Mikroskopie*, I. Sonderband „Beiträge zur Fluoreszenzmikroskopie“, S. 46.
- und H. Schindler, 1951: Vitalfärbung von Algenzellen mit Toluidinblaulösungen gestufter Wasserstoffionenkonzentration, *Protoplasma* 40, 137.
- 1953: Volle und leere Zellsäfte bei Algen. *Protoplasma* 45, 173.
- Kinzel, H., 1953: Die Bedeutung der Pektin- und Zellulosekomponente für die Lage des Entladungspunktes pflanzlicher Zellwände. *Protoplasma* 42, 209.
- 1954 a: pH-Werte alkalischer Phosphatpufferlösungen. *Protoplasma* 43, 441.
- 1954 b: Theoretische Betrachtungen zur Speicherung basischer Vitalfarbstoffe in leeren Zellsäften. *Protoplasma* 44, 52.
- 1955: Zur Kausalfrage der Zellwand-Fluorochromierung mit Akridinorange. *Protoplasma* 45, 75.
- 1958: Metachromatische Eigenschaften basischer Vitalfarbstoffe. *Protoplasma* 50, 1.
- 1959: Über Gesetzmäßigkeiten und Anwendungsmöglichkeiten der Zellsaft-Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen. *Ber. dtsch. bot. Ges.* 72, 253.
- und W. Url, 1954: Katalasebestimmungen an grünen Blättern unter Berücksichtigung des Säurefehlers. *Physiologia Plantarum* 7, 835.
- Overbeck, G., 1957: Zellphysiologische Studien an *Bryophyllum* im Zusammenhang mit dem täglichen Säurewechsel. *Protoplasma* 48, 241.
- Pilz, Ch., 1959: Kritische Untersuchungen zur „Range indicator“-Methode nach Small. *Flora* 147, 317.
- Rose, D. H., and A. M. Hurd-Karrer, 1927: Differential staining of specialized cells in *Begonia* with indicators. *Plant. Physiol.* 2, 441.
- Ruhland, W., und K. Wetzel: Zur Physiologie der organischen Säuren in grünen Pflanzen. I. Wechselbeziehungen im Stickstoff- und Säurestoffwechsel von *Begonia semperflorens*. *Planta* 1, 558.
- Small, J., 1955: The pH of plant cells. *Protoplasmatologia*, Bd. II, B, 2, C (Wien).
- 1956: Estimation of pH-Values (Living tissues and saps). In: K. Paech und M. V. Tracey, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. I, S. 375.
- Strugger, S., 1936: Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. *Protoplasma* 26, 56.
- 1940: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. *Jenaische Ztschr. f. Naturw.* 73, 97.
- 1941: Zellphysiologische Studien mit Fluoreszenzindikatoren. I. Basische, zweifarbige Indikatoren. *Flora* 155, 101.
- 1949: *Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze*. 2. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Züttl, P., 1960: Vitalfärbestudien mit Methylrot. *Protoplasma* 51, 465.

Zum Bau der Plastidenzentren in Wurzelproplastiden

Von

P. Sitte

Aus dem Botanischen Institut der Universität Heidelberg

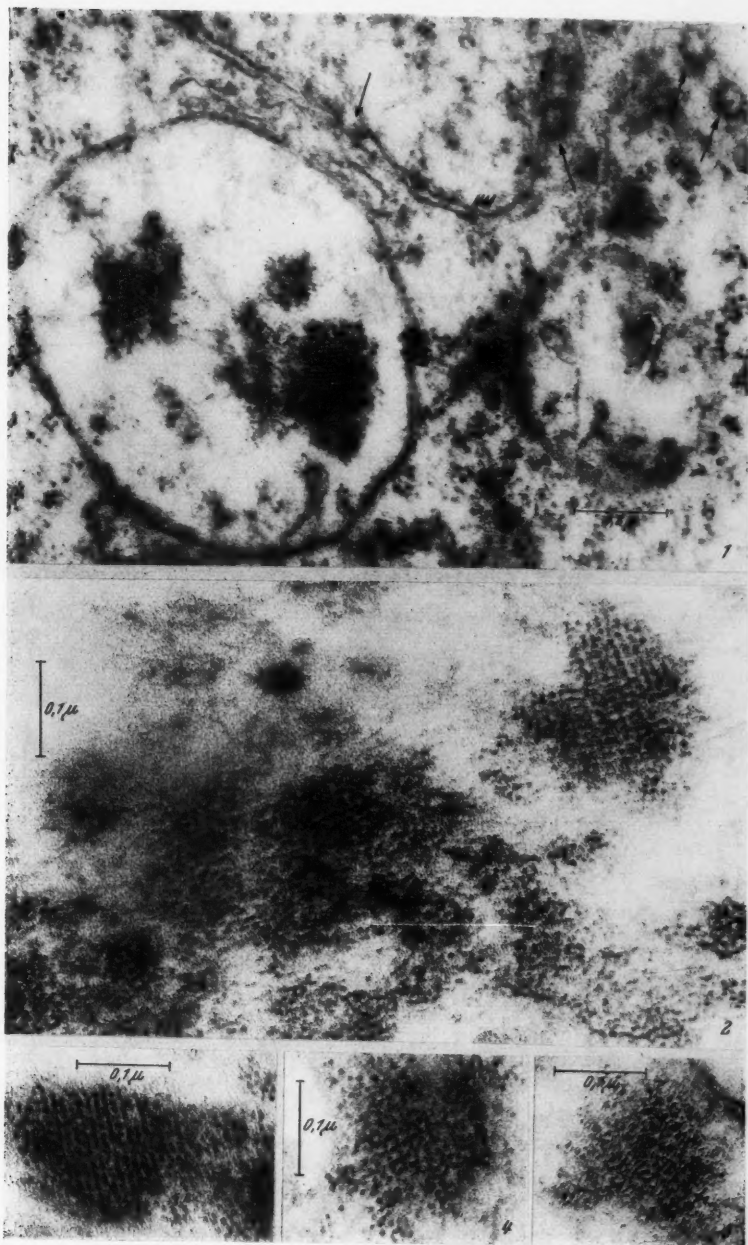
Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. August 1960)

Während man über den Bau von Plastidenzentren aus der Sproßregion durch eine stattliche Anzahl von Veröffentlichungen vergleichsweise gut unterrichtet ist (Heitz 1954, 1956; Leyon 1954; Perner 1956; v. Wettstein 1959; Mühlethaler und Frey-Wyssling 1959), ist die Zahl der Mitteilungen über die Struktur der Zentren von Wurzelproplastiden gering. Wohl die erste Arbeit, in der nähere Angaben darüber gemacht werden, ist die von Strugger (1957) über mögliche Teilungsstadien der Primärgranen in *Allium*-Wurzeln; danach besteht das Plastidenzentrum „...in diesem Falle aus sehr kleinen, globulär erscheinenden Strukturelementen, welche in einer mehrdimensionalen Ordnung liegen“ (l. c. S. 282). Verfasser hatte inzwischen unabhängig bei der Erbsenwurzel gefunden, daß auch dort das Plastidenzentrum aus einer Ansammlung stark osmiophiler, globulärer Einheiten von knapp 6 nm Durchmesser gebildet wird, die als Makromoleküle angesprochen wurden (Sitte 1958); eine Anordnung in Netzebenen eines Gitters, wie sie Strugger gefunden hatte, konnte dabei seinerzeit nicht festgestellt werden, obwohl danach gesucht worden war.

Eine erneute Untersuchung ergab nun aber, daß auch bei der Erbse gelegentlich kristallgitterartige Strukturen beobachtbar sind (Abb. 1—4). Der negative Befund der früheren Mitteilung und der Umstand, daß auch bei der erneuten Untersuchung in der überwiegenden Mehrzahl der Plastidenzentren keine Gitterordnung nachzuweisen war, ist möglicherweise der

Abb. 1—5: Plastidenzentren von Wurzelproplastiden der Erbse. — 1: Proplastid mit doppelt konturierter Membran und kräftig kontrastierten Zentrumbereichen. NM = Kernmembran; Pfeile: „Poren“ und Annuli dieser Membran. 75.000 : 1. 2—4: Gitterartig geordnete Bereiche in Plastidenzentren. 150.000 : 1. 5: Ausschnitt aus dem in Abb. 2 dargestellten Plastidenzentrum; durch kräftige Elektronenbestrahlung sind die Elementareinheiten geschmolzen. 150.000 : 1.



Labilität dieser Strukturen zuzuschreiben, die wohl vor allem das Einpolymerisieren in Plexiglas nur ausnahmsweise überstehen; es ist also nicht ausgeschlossen, daß im nativen Zustand alle Zentren der Wurzelplastiden kristallartig aufgebaut sind.

Die Abstände der Netzebenen liegen um 100 AE (Vermessung der Originale von Abb. 1—3 ergab Werte zwischen 87 und 95 AE, bei Abb. 4 106 und 118 AE¹); das liegt beträchtlich unter dem, was für die entsprechenden Abstände bei Plastidenzentren aus dem Sproßbereich verschiedener Pflanzen gefunden wurde (Tab. 1; Werte um 370 AE streuend).

Tab. 1. Abstände von Gitterebenen bei verschiedenen Plastidenzentren.
(Die Angaben entstammen mit einer Ausnahme der Vermessung veröffentlichter Abbildungen.)

Autor (Veröff.)	Objekt	Abstand der Netzebenen in AE	Bemerkungen
Heitz (1954)	<i>Chlorophytum spec.</i>	475	in Abb. 1 vermessen
		375	in Abb. 2 vermessen
Heitz (1956)	<i>Eranthemum leuconeurum</i>	213	in Abb. 1 vermessen
Perner (1956)	<i>Chlorophytum comosum</i>	450	in Zusammenfassg. vom Autor angegebener Mittelwert (S. 560)
		320	in Abb. 6 vermessen
		250	in Abb. 8 vermessen
		427	in Abb. 10 vermessen
		440	in Abb. 13 vermessen
		400	in Abb. 14 vermessen
		300	
Mühlethaler u. Frey-Wyssling (1959)	<i>Chlorophytum sternbergianum</i>	375	in Abb. 7 vermessen

In diesem Unterschied kommt die verschiedene Größe der Gitterelemente (Elementareinheiten im Sinne Perners) zum Ausdruck: Während sich ihr Durchmesser bei Plastidenzentren des Sproßbereiches auf etwa 190 AE beläuft (Perner 1956), erreicht er hier nur etwa ein Drittel davon.

Die Winkel, welche von sich schneidenden Netzebenen eingeschlossen werden, schwanken um 80° (geringster Wert: 75°, Abb. 3; höchster Wert: 84°, Abb. 4). In Bestätigung der früheren Befunde konnte auch bei der Nachuntersuchung keine Struktur der Elementareinheiten aufgelöst werden. Bemerkenswert ist der Befund, daß sie — als einzige Strukturkomponente im Ultradünnschnitt — bei stärkerer Bestrahlung im Elektronenmikroskop schmelzen können (Abb. 5). In Übereinstimmung mit den Angaben der früheren Mitteilung waren auch bei der erneuten Untersuchung strukturelle oder lagemäßige Beziehungen des Zentrums zu den auch in Wurzelpro-

¹ In der erwähnten Mitteilung von Strugger sind entsprechende Angaben oder vermeßbare Abbildungen nicht enthalten.

plastiden häufig vorkommenden Bläschen und Stromamembranen nicht feststellbar.

Aus den erhaltenen Elektronenmikrogrammen nähere Anhalte über den Gittertyp zu gewinnen, war nicht möglich. Das Original der Abb. 4 läßt sich — nicht ohne gewisse Unsicherheiten — entsprechend dem Schema von Abb. 6 deuten. Aus diesen Abbildungen ergibt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit, daß keine Dichtestpackung der Elementareinheiten vorliegt, ein für gitterartig angeordnete Makromoleküle beachtenswerter Befund. Da rechte Winkel in den Gitterstrukturen nicht beobachtet werden konnten²), kommt ihnen niedrige Symmetrie zu und der Schluß auf nichtkugelige Elementareinheiten liegt nahe. Nun ist zwar nicht auszuschließen, daß die osmiophilen, kugelig erscheinenden Makromoleküle lediglich kräftig kontrastierte Mittelpunkte nicht kugeliger, zusammengesetzter Teilchen vorstellen; doch dürfte es wenig Sinn haben, solche Spekulationen ohne bessere Fundierung weiter zu verfolgen.

Immerhin ergeben sich aus der Ultrastruktur der Zentren von Wurzelproplastiden, soweit sie geklärt werden konnten, einige

klarer unreibare Probleme, die dadurch an Aktualität gewinnen, daß die Verwandtschaft zwischen den Plastidenzentren aus Wurzel- und Sprozellen nun doch größer erscheint, als nach den Ergebnissen der ersten Untersuchung angenommen werden konnte. Das sind vor allem die Probleme der stofflichen Zusammensetzung, der Bildung und der möglichen weiteren Entwicklung dieser Zentren. Schmelzbarkeit und starke Osmierung der Elementareinheiten deuten auf einen hohen Lipoidgehalt hin; daß auch Plasmochrome eingelagert sind, bleibt hier freilich zweifelhaft. Über die Bildung lassen sich vorerst kaum weitere Angaben machen; wegen des einfachen Baues der Elementareinheiten ist hier eine Ableitung von Membraneinstülpungen ent-

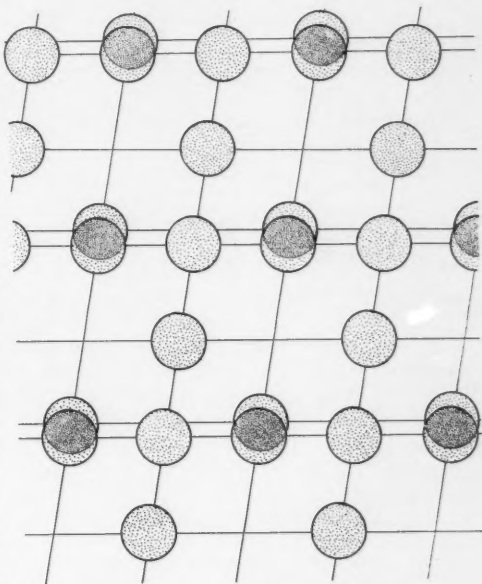


Abb. 6: Schema zu Abb. 4, vgl. Text.

² Es ist möglich, daß die Strukturen beim Schneidevorgang verformt werden. Allerdings sind auch bei den Plastidenzentren der Sprozellen bisher nur schiefe Gitterwinkel abgebildet worden.

sprechend der interessanten Theorie von Mühlethaler und Frey-Wyssling (1959) vorerst schwer vorstellbar (vgl. jedoch die Befunde von Wohlfarth-Bottermann 1959, über die reversible Umwandlung lamellärer in granuläre Strukturen). Über das Verhalten des Plastidenzentrums und die Veränderungen seiner Ultrastruktur bei allfälligem Ergrünen ist noch nichts bekannt.

Methodische Angaben: Fixierung mit nicht gepufferten, 1%iger OsO_4 -Lösung, Uranylkontrastierung nach Strugger (1956); Methacrylateinbettung bei 50°C; Ultradünnschnitte mit Reichert-Ultramikrotom nach H. Sitte. Aufnahmen: Siemens-Elmiskop I.

Mein Dank gilt Herrn Dr. K. Weber für seine Mithilfe beim Versuch der Gitterklassifizierung, Herrn Dr. H. Falk für die Aufnahmen 1 und 4, schließlich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die die Untersuchung großzügig unterstützte.

Summary

A detailed description is given of crystal lattice-like structures in the plastid-center of proplastids of the pea radicle, illustrated by electron micrographs.

Literatur

- Heitz, E., 1954: Kristallgitterstruktur des Granums junger Chloroplasten von *Chlorophytum*. Exper. Cell Res. 7, 606—608.
- 1956: Kristallgitterstruktur in den jungen Chloroplasten einer Diktyledone (*Eranthemum leuconeum*). Experientia 12, 476.
- Leyon, H., 1954: The structure of chloroplasts, VI: The origin of the chloroplast laminae. Exper. Cell Res. 7, 609.
- Mühlethaler, K., und A. Frey-Wyssling, 1959: Entwicklung und Struktur der Proplastiden. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. 6, 507—512.
- Perner, E. S., 1956: Die ontogenetische Entwicklung der Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*. I. Die Persistenz des Primärgranums und seine fragile Kristallgitter-Struktur im Proplastid. Z. Naturforschg. 11 b, 560—566.
- Sitte, P., 1958: Die Ultrastruktur von Wurzelmeristemzellen der Erbse. Protoplasma 49, 447—522.
- Strugger, S., 1956: Die Uranylacetat-Kontrastierung für die elektronenmikroskopische Untersuchung von Pflanzenzellen. Naturwiss. 43, 357.
- 1957: Elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Teilung der Proplastiden im Urmeristem der Wurzelspitze von *Allium cepa*. Z. Naturforschg. 12 b, 280—285.
- Wettstein, D. v., 1959: Developmental Cytology. New York (Ronald Press).
- Wohlfarth-Bottermann, K. E., 1959: Die elektronenmikroskopische Untersuchung cytoplasmatischer Strukturen. Verh. dtsh. zool. Ges. Münster i. W., Zool. Anzeiger 1959, 393—419.

Das Characeen-Protoplasma und seine Inhaltskörper (II. Elektronenmikroskopischer Befund)

Von

J. Klima und R. Jarosch

Aus dem Elektronenmikroskopischen Laboratorium der Tierärztlichen Hochschule Wien (Vorstand: Prof. Dr. E. Gratzl) und der biologischen Forschungsabteilung der Österreichischen Stickstoffwerke AG. (Vorstand: Prof. Dr. H. Linser) sowie der Mikrobiologischen Station der Stadt Linz (Vorstand: Prof. E. Schild)

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. September 1960)

Einleitung

Vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an pflanzlichem Protoplasma liegen bisher in geringerer Zahl vor als an tierischem. Dies scheint um so bedauerlicher, als die Pflanzenzellen der Protoplasmaforschung viele experimentelle Möglichkeiten bieten, die den tierischen Zellen fehlen. In einer ersten Arbeit wurde eine ausführliche Beschreibung der lichtmikroskopischen Morphologie des Characeen-Protoplasma gegeben (Jarosch 1960). Nun soll ein Bericht über die elektronenmikroskopische Untersuchung folgen, wobei versucht wurde, die lichtmikroskopischen Befunde mit den elektronenmikroskopischen zur Deckung zu bringen. In einer späteren Arbeit sollen noch die Veränderungen nach verschiedenen experimentellen Einflüssen untersucht werden.

Methodik

Etwa 3 cm lange, frisch gewachsene Internodialzellen von *Nitellopsis stelligera* wurden — in der Längsachse orientiert — zentrifugiert (5 Min. bei 2000 Touren). Beim Zentrifugieren kommt es — wie auch schon Beobachtungen von Linsbauer (1929) und Breckheimer-Beyrich (1949) ergeben haben — zur Bildung von intravakuolären Plasmakugeln. Die Zellen wurden dann mikroskopisch kontrolliert und beschädigte Zellen ausgeschieden. Ehe die Rotationsströmung — welche auch den Zellsaft passiv bewegt — die in ein Zellende geschleuderten Plasmakugeln wieder gleichmäßig verteilen konnte, wurde unter dem Mikroskop plasmolysiert (5% Glycerin, ca. 1 Min.) und dann in 1%iger ungepufferter Osmiumsäure fixiert

(2 Stunden im Kühlschrank). Die weitere Behandlung und Einbettung in Plexiglas erfolgte in der üblichen Weise. Das untersuchte Plasma stammt also von ausgewachsenen Pflanzenzellen mit großer Zentralvakuole.

Geschnitten wurde mit Glasmessern auf dem Reichert-Ultramikrotom; die Schnitte zeigten nach dem Spreiten auf warmem Wasser silberne bis goldene Interferenz und wurden mit alkoholischer Phosphorwolframsäure nachkontrastiert. Aufnahmen mit Elmiskop I auf Gevaert 23 D 50, Entwickler Agfa 22.

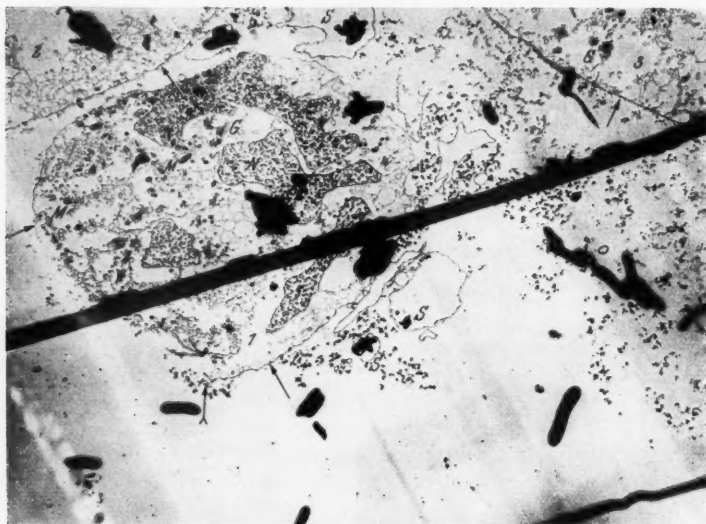


Abb. 1. Übersicht über eine zentrifugierte Internodialzelle von *Nitellopsis stelligera*. Man sieht drei Anschnitte von Protoplasmatropfen (1, 2, 3). Pfeile weisen auf die begrenzen Membran, die stellenweise (gefiederter Pfeil) fehlt. In einem Plasmotropfen finden sich Zellkerne (N), Chondriosomen (M), Dictyosomen (G) und Körperchen bisher noch unbekannter Art (Ringkörperchen). Außer den erwähnten Körperchen sieht man das Spitzenwerk des Endoplasmatischen Retikulum. Neben den Plasmotropfen liegen die lichtmikroskopisch als „Eiweißschollen“ (s) bezeichneten Körper, umgeben von einer deformierten Membran. Vergrößerung 5000 : 1.

Eigene Beobachtungen

Abb. 1 zeigt eine Übersicht von Anschnitten dreier Protoplasmatropfen. Die äußere Membran ist nicht straff gespannt, was auf Schrumpfungsvorgänge während der Einbettung zurückzuführen ist. Das stellenweise Fehlen dieser Membran ist sicher als ein Artefakt zu deuten. Schon bei dieser geringen Vergrößerung fällt auf, daß das Protoplasma keine gleichmäßige Dichte zeigt. Die vielgestaltigen Anschnitte des Endoplasmatischen Retikulum, dessen Membranen sehr gut erhalten und kontrastiert sind, erinnern

an ein Spitzenwerk. Dazwischen liegen die Chondriosomen, die Dictyosomen und die „Ringkörperchen“ (anfangs von Jarosch [1960] als „Pro-Sphärosomen“ bezeichnet), deren elektronenmikroskopisches Bild bis jetzt nicht bekannt war. In einem der drei Plasmotropfen finden sich Anschnitte von vier Zellkernen. Die äußere Form dieser Zellkerne mit ihren vielen scharfen Knicken in der Kontur ist sicher auf die für den Kern nicht optimale Fixierung zurückzuführen. Neben den Plasmotropfen erkennt man verschieden große, stark zerklüftete Gebilde (S), die von einer

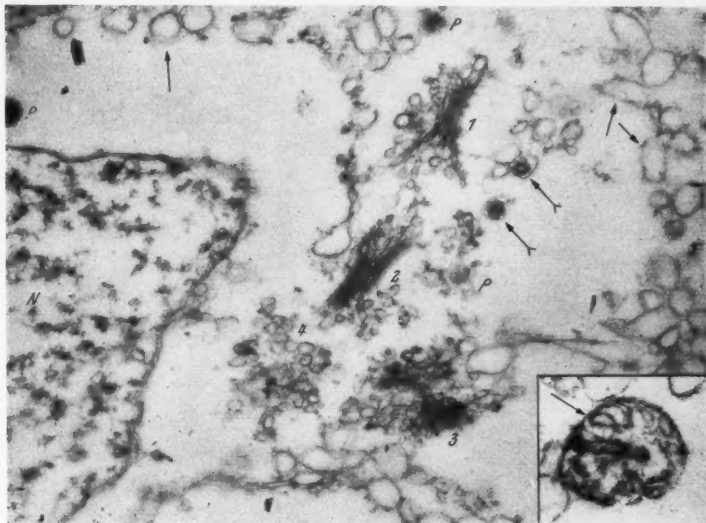


Abb. 2.

Abb. 3.

Abb. 2. Ausschnitt aus Bild 1. Man erkennt vier Dictyosomen (1, 2, 3, 4), von denen eines (4) nur die Bläschen erkennen läßt. Die Anschnitte des Endoplasmatischen Retikulum zeigen häufig einseitig verbreiterte Membranen (Pfeile). Man erkennt den Anschnitt eines Zellkernes (N) und zwei Ringkörperchen, deren Membran einseitig fehlt (gefiederter Pfeil) sowie drei weitere gut erhaltene (P). Vergrößerung 50.000 : 1.

Abb. 3. Chondriosom aus einem Protoplasmatropfen. Die Sacculi mitochondriales und stellenweise (Pfeil) die doppelte Außenmembran sind deutlich zu sehen. Vergrößerung 50.000 : 1.

dunklen Kontur umgeben sind und kleine Hohlräume enthalten. Es handelt sich hier wohl um die lichtmikroskopisch beschriebenen „Eiweißschollen“. Sie sind von einer durch die Einbettung stark deformierten Membran umgeben, die der Blase der bekannten, im Zellsaft schwimmenden „Blaskugeln“ (Härtel 1951) entspricht. Der im Zellsaftraum sichtbare Niederschlag ist eine durch das Fixieren bedingte Ausfällung.

Durch das Zentrifugieren wird die Struktur des Protoplasma so wenig gestört, daß die entstandenen Tropfen noch mehrere Stunden ungestörte Plasmaströmung aufweisen. Da sehr kurze Zeit (5 bis 15 Min) nach dem Zentrifugieren fixiert wurde, muß das Plasma jedes Tropfens zum Zeitpunkt des Fixierens noch immer geströmt haben.

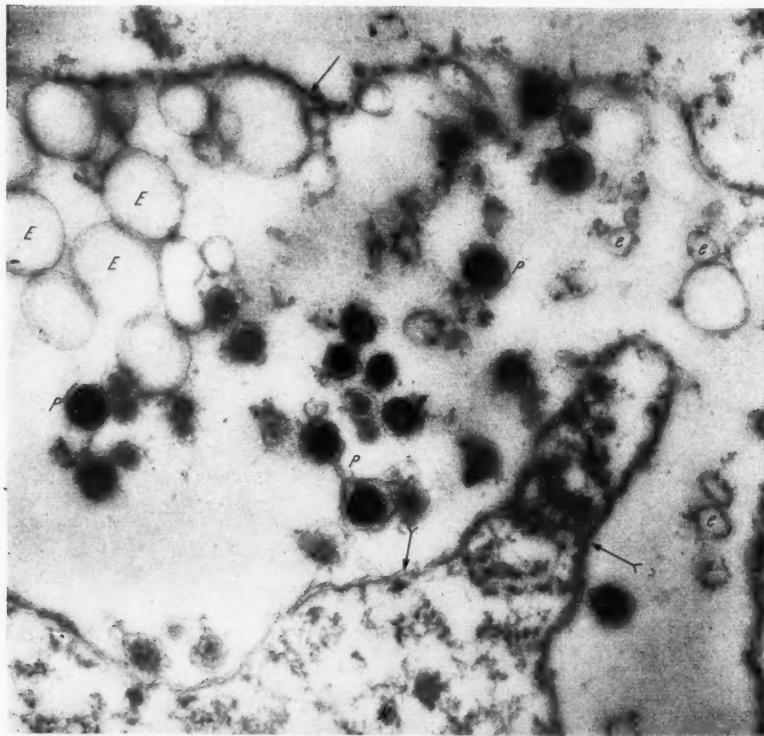


Abb. 4. Ausschnitt aus einem Protoplasmatropfen. Man erkennt seine umhüllende Membran (Pfeil), Bläschen (E) und Schläuche (e) des Endoplasmatischen Retikulum, den Anschnitt eines Zellkernes (N) mit doppelter Kernmembran (gefiederter Pfeil) und zahlreiche Ringkörperchen (P). Vergrößerung 50.000 : 1.

Sein Endoplasmatisches Retikulum (Abb. 2) zeigt im Anschnitt zahlreiche kreisförmige bis kurz-elliptische, nur selten unregelmäßige Schnittfiguren, auch selten und nur über kurze Strecken parallel verlaufende Membranen. Dennoch handelt es sich bei den kreisförmigen bis elliptischen Anschnitten nicht nur um die Schnitte unverbunden nebeneinanderliegender Bläschen, sondern auch um kurze Schläuche, die einen sehr gewundenen Verlauf zeigen und sehr selten miteinander anastomosieren, denn es ist auffallend, wie häufig die Membranen einseitig ihre scharfe Kontur verlieren und als

breiteres, verwaschenes Band erscheinen. Die Durchmesser dieser Schläuche liegen in der Größenordnung von $0,1$ bis $0,5 \mu$, vereinzelt finden sich Anschnitte von wesentlich größerem Durchmesser ($0,5 \mu$). In letzterem Fall handelt es sich wohl um die Anschnitte kugelförmiger Bläschen (Abb. 4 E), die wahrscheinlich aus dem früher beschriebenen Netzwerk hervorgegangen sind. Nur selten konnte ein Meiosomenbesatz der Membranen festgestellt werden. Die extrazisternale Phase (Klima 1959) ist nur an dem Vorkommen der Mitochondrien von der intrazisternalen Phase zu unterscheiden und nicht an einer unterschiedlichen Elektronendichte. Die auffallende „Leere“ des Grundplasma geht sicher zum Teil auf den großen Wasserreichtum des Characeenplasma, zum Teil auch auf die für diese kleinen Objekte lange Fixierungszeit von zwei Stunden zurück.

Die Konfiguration des Endoplasmatischen Reticulum im Elektronenmikroskop kann gut die stellenweise schaumige Struktur des Plasmas im Lichtmikroskop erklären.

Die Chondriosomen sind wie überall im Pflanzenreich ausgebildet, nämlich mit doppelter Außenmembran und *Sacculi mitochondriales*, welche als

Einstülpungen des inneren Blattes der Außenmembran gebildet werden.

Auch die Dictyosomen (Abb. 2) haben prinzipiell den gleichen Bau wie die bisher bei Pflanzenzellen untersuchten. Sie sind Stapel von Doppelmembranen mit zahlreichen randständigen Bläschen. Bei gewissen Schnittlagen kann ein Dictyosom auch nur als Ansammlung zahlreicher Bläschen erscheinen. Diese Bläschen weisen aber einen geringeren Durchmesser ($0,05 \mu$) als die Anschnitte des Endoplasmatischen Retikulum auf. Ein Übergang dieser Bläschen in das Endoplasmatische Retikulum ist wahrscheinlich, aber noch nicht gesichert. Jarosch (1960) hat Chondriosomen und Dictyosomen im Lichtmikroskop noch nicht getrennt und drei Arten von Chondriosomen beschrieben. Die Chondriosomen *a* und *b* sind, nach dem Elektronenmikroskop zu urteilen, echte Chondriosomen, bei den Chondriosomen *c* handelt es sich um Dictyosomen, deren Erscheinungsbild wesentlich von ihrer Lage abhängt.

Außer Chondriosomen und Dictyosomen findet man kleine, kugelige Körperchen in sehr großer Anzahl. Sie bestehen aus einem elektronendichten,

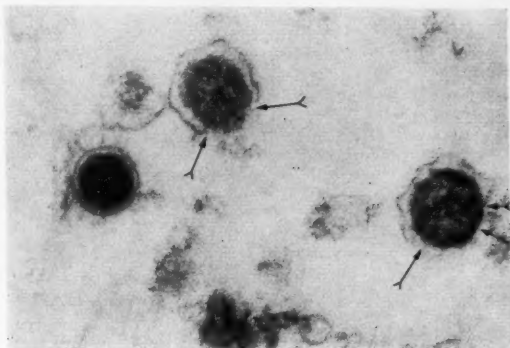


Abb. 5. Stärker vergrößerter Ausschnitt aus Bild 4. Man erkennt drei Ringkörperchen, davon eines mit randlicher Granula des Binnenkörpers (Pfeil), zwei mit einseitig fehlender Membran (gefiederter Pfeil). Vergrößerung $60.000 : 1$.

kugelförmigen Körper, der von einer Membran umgeben ist. Im Inneren dieses dunkel erscheinenden Körpers befinden sich granuläre Strukturen, mitunter auch kleine Bläschen (Abb. 4, 5 und 6). Der Durchmesser dieser Gebilde beträgt mit Membran 0,25 bis 0,30 μ und ohne Membran gemessen 0,20 bis 0,25 μ . Ein Zusammenhang der Membranen dieser Körperchen untereinander oder mit den Membranen des Endoplasmatischen Retikulum konnte bisher noch nicht gefunden werden. Häufig finden sich Körperchen, die einseitig keine Membran mehr zeigen, vereinzelt auch Formen, die an freie Binnenkörper erinnern.

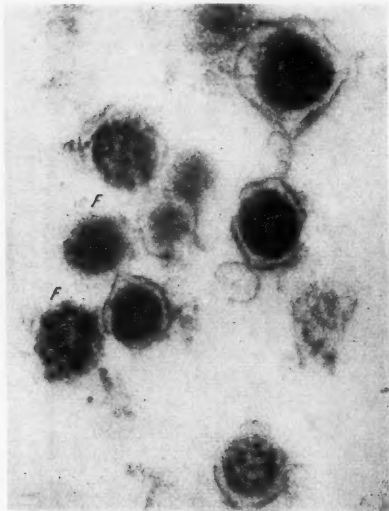


Abb. 6. Stärker vergrößerter Ausschnitt aus Bild 4. Ringkörperchen und freie Binnenkörper (F). Vergrößerung 60.000:1.

Nach ihrer Anzahl und ihrer Größenordnung kann es sich nur um die von Jarosch (1959) als kleine Mikrosomen und (1960) als Pro-Sphärosomen bezeichneten Körperchen handeln, die jetzt als „Ringkörperchen“ bezeichnet werden. Ihre Vielseitigkeit im elektronenmikroskopischen Bild erlaubt vorerst nicht, Art und Richtung des Gestaltwandels festzulegen. Der von Jarosch (1960) angenommene Wandel von Pro-Sphärosomen zu Sphärosomen konnte im Elektronenmikroskop weder bestätigt noch widerlegt werden, weil sich die Sphärosomen in viel geringerer Anzahl als die „Ringkörperchen“ vorfinden und nicht mit Sicherheit identifiziert werden konnten.

Der Zellkern hat eine doppelte Kernmembran mit Poren, die äußere Membran steht im Zusammenhang mit dem Membransystem des Endoplasmatischen Retikulum (Abb. 4); so gleicht er durchaus den bisher aus Tier- und Pflanzenreich bekannten Zellkernen. In zwei Zellkernen (Tropfen 1 in Abb. 1) sind Nukleolen als dichte, dunkle Körper sichtbar.

Diskussion

Vom Characeen-Protoplasma liegen bisher nur drei Arbeiten in der Literatur vor, nämlich Sponsler und Bath (1955), Mercer und Mitarb. (1955) und Hodge und Mitarb. (1956). Die erste Arbeit betrifft nur die Chloroplasten, während die beiden letzteren auch andere Plasmakomponenten berücksichtigen. Hodge und Mitarb. (1956) beschreiben aus jungen *Nitella*-Zellen die Dictyosomen, die sie „clusters of vesicles“ nennen. Sie nehmen an, daß die Membranen in der Mitte Verschmelzungsprodukte der randständigen Bläschen sind und daß diese Membranen mit zunehmendem

Alter der Zellen noch bedeutend wachsen. Diese Deutung wird aber unwahrscheinlich durch den Nachweis, daß die Dictyosomen in ausgewachsenen Zellen die gleichen Formen besitzen, wie sie aus den jungen Apikalzellen beschrieben wurden. Perner (1958) erkannte, daß es sich bei den „clusters of vesicles“ um Teile des Golgisystems handelte. Da durch die Arbeit von Weissenfels (1959) der Ausdruck Golgikörper zwei Bedeutungen erhielt, ist er hier durch Dictyosom ersetzt worden.

In der elektronenmikroskopischen Literatur finden sich nur wenige Stellen, die andere Inhaltskörper als Mitochondrien, Dictyosomen und Chloroplasten erwähnen. Hodge und Mitarb. (1957) beschreiben dichte Körperchen — ohne jede umgebende Membran — mit einem Durchmesser von 0,15 bis 0,20 μ , die nach Zerreiben und scharfem Zentrifugieren von pflanzlichem Protoplasma aufgefunden wurden. Am häufigsten traten diese Körperchen in jener Fraktion auf, die bei 20.000 g 15 Min. zentrifugiert wurde und zahlreiche gemischte Partikel enthielt.

Strugger (1957) fand sternförmige Körperchen; von Sitte (1958) wurden sie als Lipoidtropfen erkannt, die durch Osmiumtetroxyd-Fixierung eine stark artifizielle Gestalt erhielten.

Natur und Charakterisierung der Sphärosomen sind auch im lichtmikroskopischen Bereich noch umstritten. Perner (1953) hält die Sphärosomen für aktiv am Stoffwechsel beteiligte, enzymhaltige Körperchen (Nadireaktion), während Drawert (1953) nur passiv am Stoffwechselgeschehen beteiligte, stark lipoidhaltige Einschlüsse sieht.

Sitte (1958) beschreibt bei Wurzelmeristemzellen der Erbse eine Zellkomponente A, die große Ähnlichkeit mit den im Characeen-Plasma aufgefundenen Körperchen besitzt. Sie haben einen Durchmesser von 0,18 bis 0,26 μ und sind von einer einfachen Membran umschlossen; ihr Inneres erscheint dichter als das umgebende Protoplasma und ist manchmal granulär. Sitte vergleicht sie mit den microbodies der tierischen Zelle. Vergleicht man die Bilder von Sitte mit denen der vorliegenden Arbeit, so fällt einem einerseits der wesentlich geringere Kontrast des Inhaltes der Zellkomponente A auf, andererseits die scharfe Abgrenzung des Binnenkörpers gegen die Membran bei den „Ringkörperchen“ des Characeen-Plasma. Beides könnte aber auf der stärkeren Auslaugung bei der für so kleine Objekte verhältnismäßig langen Fixierung beruhen.

Die Gestalt des Endoplasmatischen Retikulum, wie sie in den Plasmotropfen der Characeen auftritt, ist bisher aus der Literatur nicht bekannt. Die Bilder von zerriebenem und scharf zentrifugiertem Plasma weisen nur eine scheinbare Ähnlichkeit auf, da in diesem Fall das Endoplasmatische Retikulum in einzelne Tropfen zerteilt ist, die nach Zusammenlagerung zwangsläufig ein ähnliches Bild ergeben müssen. Die streng parallele Ausrichtung des Endoplasmatischen Retikulum innerhalb des äußersten Randbelages des Characeen-Protoplasten (Hodge und Mitarb. 1956) und dessen gleichmäßige Verteilung innerhalb des Plasmatropfens beruht auf den unterschiedlichen Kräften, denen das sehr wasserhaltige und strömende Plasma in diesen beiden Fällen ausgesetzt ist. Die von Jarosch (1959, 1960) beschriebenen Fibrillenbündel und Sphärosomen konnten bisher im

Elektronenmikroskop noch nicht aufgefunden werden. Doch wird die Eigenart, daß sich die „Pro-Sphärosomen“ an die Fibrillenbündel anlagern, sicher zu ihrer Identifizierung beitragen.

Zusammenfassung

Internodialzellen von *Nitellopsis stelligera* wurden niedertourig zentrifugiert (5 Min., 2000 Touren), die dabei entstehenden Protoplasmatropfen fixiert und im Ultradünnschnitt elektronenmikroskopisch untersucht. Chondriosomen, Dictyosomen, Konfiguration des Endoplasmatischen Retikulum und bisher unbekannte Einschlusskörperchen („Ringkörperchen“) werden beschrieben und mit lichtmikroskopischen Befunden zur Deckung gebracht.

Literatur

- Breckheimer-Beyrich, H., 1949: Über die Wirkung zentrifugaler Kräfte auf das Protoplasma von *Nitella flexilis*. Ber. dtsh. bot. Ges. 62, 55.
- Drawert, H., 1953: Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Janusgrün, Niblausulfat und Berberinsulfat. Ber. dtsh. bot. Ges. 66, 134.
- Härtel, O., 1951: Die Stachelkugeln von *Nitella*. Protoplasma 40, 526.
- Hodge, A. J., E. M. Martin, and R. K. Morton, 1957: The structure of some cytoplasmic components of the plant cells in relation to the biochemical properties of isolated particles. J. biophys. biochem. Cytol. 3, 61.
- J. D. McLean, and F. V. Mercer, 1956: A possible mechanism for the morphogenesis of lamellar systems in plant cells. J. biophys. biochem. Cytol. 2, 597.
- Höfler, K., 1957: Mikrosomen und Meiosomen. Protoplasma 48, 167.
- 1960: Meiosomes and groundplasma. Protoplasma 52, 295.
- Jarosch, R., 1958: Die Protoplasmafibrillen der Characeen. Protoplasma 50, 93.
- 1961: Das Characeen-Protoplasma und seine Inhaltskörper (I. Lichtmikroskopischer Befund). Protoplasma 53, 34.
- Klima, J., 1959: Das Bild des Endoplasmatischen Retikulums von *Planaria alpina* in Abhängigkeit vom pH-Wert des Fixierungsmittels (I). Protoplasma 51, 415.
- Linsbauer, K., 1929: Untersuchungen über Plasma und Plasmaströmung an Chara-Zellen. I. Beobachtungen an mechanisch und operativ beeinflussten Zellen. Protoplasma 5, 563.
- Mercer, F. V., A. J. Hodge, A. B. Hope, and J. D. McLean, 1955: The structure and swelling properties of *Nitella* chloroplasts. Aust. J. biol. Sci. 8, 1.
- Perner, E. S., 1953: Die Sphaerosomen (Mikrosomen) pflanzlicher Zellen. Protoplasma 42, 457.
- 1958: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Cytomorphologie des sogenannten „Golgisystems“ in den Wurzelzellen verschiedener Angiospermien. Protoplasma 49, 407.
- Sitte, P., 1958: Die Ultrastruktur der Wurzelmeristemzelle der Erbse (*Pisum sativum*). Protoplasma 49, 447.
- Sponsler, O. L., and J. D. Bath, 1954: Some features of *Nitella* chloroplasts as revealed by the electron microscope. Protoplasma 44, 332.
- Strügger, S., 1957: Schraubig gewundene Fäden als sublichtmikroskopische Strukturelemente des Cytoplasmas. Ber. dtsh. bot. Ges. 70, 91.
- Weissenfels, N., 1959: Golgikörper im Phasenkontrast und elektronenmikroskopischen Bild von Hühnerherzmyoblasten. Naturw. 46, 233.

Referate

Chemische Mutagenese. Erwin-Baur-Gedächtnisvorlesungen I, 1959. Veranstalter vom Institut für Kulturpflanzenforschung Gatersleben der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin. Herausgegeben von H. Stubbe. Redaktion: H. Böhme. Mit 44 Abbildungen, davon 8 Abbildungen auf 3 Kunstdrucktafeln, 15 Tabellen. Berlin: Akademie-Verlag 1960. Brosch. DM 18.50.

Aus Anlaß der Feiern zum 25. Todestag von Erwin Baur wurde von den veranstaltenden deutschen Genetikern der Plan gefaßt, alle 2 bis 3 Jahre am Institut für Kulturpflanzenforschung in Gatersleben ein Symposium unter dem Titel „Erwin-Baur-Gedächtnisvorlesungen“ abzuhalten, um das Andenken an den großen Genetiker bei den jüngeren Forschergenerationen wachzuhalten. Der Bericht über die erste dieser Gedächtnisvorlesungen liegt nun vor. Als Thema wurde die chemische Mutagenese gewählt, die sich in den letzten Jahren eines außerordentlichen Interesses zu erfreuen scheint. Man wundert sich darüber nicht, wenn man liest, daß Reagenzien gefunden wurden, die eine maximale Mutationsrate bis zu 50% auslösen können (so das Äthyl-methansulfonat). Zwei Verbindungsgruppen stehen hier im Brennpunkt des Interesses: Erstens eine Reihe von alkylierenden Reagenzien (Alkansulfonsäure-ester, Epoxyde und Epimine) und zweitens die salpetrige Säure, die bekanntlich eine desaminierende Wirkung hat. Vor allem im Falle der HNO_2 ist auch der Reaktionsmechanismus schon etwas durchsichtig geworden. Ein besonders geeignetes Untersuchungsobjekt ist hierbei das Tabakmosaikvirus, dessen RNS allein, wie bekannt, zur Infektion von Pflanzen und zur Reproduktion des ganzen Virus ausreicht. Hier ist der Ansatzpunkt der mutagenen bzw. inaktivierenden Wirkung der HNO_2 bereits ziemlich klar: Es handelt sich um eine Desaminierung von Nukleinsäure-Basen (aus Adenin wird Hypoxanthin, aus Guanin Xanthin, aus Cytosin Uracil). Wird an nur einem der 6000 Nukleotide der TMV-RNS die Base desaminiert, dann tritt mit 50% Wahrscheinlichkeit Inaktivierung, sonst wohl „Mutation“ ein. Auch an *Escherichia coli* kann HNO_2 bemerkenswerte Veränderungen auslösen, und zwar entweder eine Inaktivierung der Fähigkeit zur Koloniebildung oder eine Stoffwechselmutation. In beiden Fällen sprechen die Ergebnisse der genauen Analyse für einen Zweitreffervorgang. Es wird vermutet, daß bei der DNS der Bakterienzelle, die nach dem Modell von Watson und Crick eine Doppelschraube darstellen soll, beide Komponenten an je einer Stelle verändert werden müssen, um Inaktivierung auszulösen. In anderen Fällen wird aber die Zweitrefferkinetik möglicherweise durch die Art der Versuchsanstellung vorgetäuscht und es handelt sich in Wirklichkeit um einen Eintreffervorgang. — Diese schönen Ergebnisse aus dem Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen wurden als Beispiele aus der bedeutenden Zahl der Beiträge herausgegriffen. Sie zeigen auch die große Bedeutung der Mikroorganismen und der Viren für die moderne Genetik. Natürlich wurde auch über chemische Mutagenese an höheren Organismen berichtet, aber dort sind, dem komplizierteren Bau der Versuchsobjekte entsprechend, die Er-

gebnisse nicht ganz so durchsichtig und eignen sich daher weniger für eine so knappe Berichterstattung.

Das Symposium hatte eine erfreulich starke Beteiligung aufzuweisen. Vor allem deutsche, englische, französische und skandinavische Forscher waren vertreten. Die Hauptreferate hielten C. Auerbach, Edinburgh (Chemical mutagenesis in animals), A. Gustafsson, Stockholm (Chemical mutagenesis in higher plants) und M. Westergaard, Kopenhagen (Chemical mutagenesis as a tool in macromolecular genetics). Den größeren Teil des besprochenen Bandes nehmen dann kürzere wissenschaftliche Originalberichte ein, dargeboten von S. H. Revell (London), C. H. Ockey (Manchester), R. Rieger und A. Michaelis (Gatersleben), A. Wacker (Berlin), A. Lovelass (London), H. Schuster, A. Gierer und K. W. Mundry (Tübingen), F. Kaudewitz (Tübingen), W. Vielmetter, H. Schuster und C. M. Wieder (Tübingen), H. Heslot (Paris), B. Györfy (Budapest), C. Auerbach und M. Westergaard (Edinburgh und Kopenhagen), sowie L. Ehrenberg (Stockholm).

Alles in allem: Ein aufschlußreicher Lagebericht von der Forschungsfront auf diesem Gebiet.
H. Kinzel (Wien).

Gessner, F.: Hydrobotanik. Bd. II. Mit 349 Abb., 8 Taf., zahlreiche Tab. XIV, 701 S. Berlin: Deutscher Verlag der Wissenschaften. 1959. Ganzl. DM 62.—.

Von Gessners großangelegter „Hydrobotanik“ liegt nunmehr der zweite Band vor. Verf. hat sich, wie bereits im Referat zum ersten Band ausgeführt (vgl. *Protoplasma* 47, 537, 1956) die große Aufgabe gestellt, eine den Landpflanzen gleichberechtigte Darstellung der Ökologie der Wasserpflanzen zu geben. Nach dem im ersten Band behandelten Energiehaushalt ist der zweite dem Stoffhaushalt gewidmet. Welch überraschende Tatsachen entnimmt man z. B. schon dem ersten Abschnitt über den Wasserhaushalt der Wasserpflanzen; man liest in den bisher vorliegenden Handbüchern der Ökologie kaum etwas davon, daß auch die Hydrophyten das Wasser keineswegs aus dem vollen schöpfen, sondern daß vielmehr auch bei ihnen begrenzende Faktoren eine oft recht bedeutende Rolle spielen. Die folgenden Abschnitte behandeln die Wirkung des Sauerstoffs, die Bedeutung des CO_2 -Ca-Systems im Süßwasser und die Verhältnisse in salzreichen Gewässern, ferner die quantitative Vegetationsentwicklung und den Nährstoffhaushalt im Wasser, die Vegetation des Benthos und schließlich die Primärproduktion. Auf breitester Grundlage, unter souveräner Beherrschung der Literatur (fast 900 Zitate!) und Einbeziehung neuer Ergebnisse eigener Forschungen in den Tropen, erstet ein Bild der Lebensverhältnisse der Wasserpflanzen, wie es bislang noch nicht vorliegt. Vielleicht macht der vorliegende Band einen noch abgerundeteren Eindruck als der erste; dazu trägt zweifellos bei, daß die Zellphysiologie in wesentlich verstärktem Maße in den Kreis der Betrachtungen gezogen wird. Bei der Behandlung der terrestrischen Algen, des Wasserhaushaltes, der Sauerstoffspannung, der Salzwirkungen und des hydrostatischen Druckes, um nur einige Beispiele zu nennen, ergeben sich ja immer wieder Berührungspunkte von Ökologie und Zellphysiologie, und man ist immer wieder überrascht, wieviele Probleme uns die Wasserpflanzen noch aufgeben. Das Werk wird jeder, der an Fragen der protoplasmatischen Ökologie interessiert ist, nur mit großem Gewinn studieren. Gerne pflichtet der Referent den bereits zum ersten Band lautgewordenen Stimmen bei, daß hier ein wirklich bedeutendes biologisches Werk entsteht. Man bedauert nur, daß der Band noch nicht in bequemer Weise an Hand eines Registers auszuschöpfen ist, sondern daß man sich damit bis zum Erscheinen des dritten, hoffentlich nicht allzulange, gedulden muß!

O. Härtel (Graz).

Vierter Internationaler Kongreß für Elektronenmikroskopie. Berlin, 10.—17. September 1958. *Verhandlungen Band II: Biologisch-medizinischer Teil*, Hrsg. von W. Bargmann, D. Peters und C. Wolpers. Mit 650 Abb., XV, 639 S. 4°. Berlin—Göttingen—Heidelberg: Springer Verlag, 1960. Ganzl. DM 196.—.

Im ersten Band der Verhandlungen sind die technisch-physikalischen Fragen behandelt. Der vorliegende Band enthält den biologischen Teil. Einleitend enthält er den Festvortrag von Francis O. Schmitt über „Electron microscopy in morphology and molecular biology“, der Geschichte, Gegenwart, Probleme und Aussichten der Elektronenmikroskopie in der biologischen Forschung, zumal der Cytologie, in knapper, klarer und treffender Form darstellt.

Das umfassende Material, das der Band enthält, ist in 7 Kapitel geteilt, nämlich: A. Elektronenmikroskopische Präparationstechnik in der Biologie (Fixieren und Schneiden), bemerkenswert hier ein Beitrag von Zeiger „Probleme der Fixation in Licht- und Elektronenmikroskopie“, der von allgemein biologischem Interesse ist; B. Histochemie und Biochemie; C. Ordnungsprinzipien in der Biologie, mit einer großen Arbeit von Hodge „Principles of ordering in fibrous systems“ und einer bemerkenswerten Diskussionsbemerkung von Bernhard; D. Membranen und Membranmodelle, u. a. mit sehr aktuellen Beiträgen von Robertson und Mercer; E. Ergebnisse der Elektronenmikroskopie in der Zellmorphologie (Zellkern, Plasma, Organellen), ein für alle Biologen interessanter Abschnitt; F. Ergebnisse der Elektronenmikroskopie in der Anatomie (Epithelgewebe, Muskelgewebe, Kollagen, Hartgewebe, Exokrine Drüsen, Endokrine Drüsen, Exkretionsorgane, Respirationsorgane, Reproduktionsorgane, Nervengewebe, Sinnesorgane), das umfangreichste Kapitel mit Beiträgen zoologischen und medizinischen Inhalts; G. Ergebnisse der Elektronenmikroskopie in der Pathologie (Tumorgewebe und Strahlenwirkungen); H. Ergebnisse der Elektronenmikroskopie in der Botanik, ein leider recht kurzer Abschnitt mit Arbeiten u. a. von Mühlethaler, Heitz und Porter; J. Ergebnisse der Elektronenmikroskopie in der Mikrobiologie (Protozoologie, Bakteriologie und — ein recht umfangreicher Abschnitt — Virologie).

Die in den Verhandlungen gesammelten Beiträge bilden selbstverständlich kein Lehr- oder Handbuch, doch gibt die große Zahl der enthaltenen Arbeiten (über 160!) wohl einen guten Überblick über den heutigen Stand elektronenmikroskopischer Forschung auf biologischem Gebiet, natürlich besonders unter dem Blickwinkel der zur Zeit aktuellen Probleme. Da die Beiträge aus dem Gebiet der Biologie in weitem Sinn stammen und nötigerweise meist recht kurz gehalten sind, erfordert die Lektüre vieler von ihnen weitgehendes Spezialwissen. Andererseits ergeben sich aber interessante Einblicke in fernerliegende Disziplinen und ihre aktuellen Forschungen. Doch sind manche Arbeiten durchaus allgemein-biologisch interessant, wie etwa jene, welche sich zum Ziel setzen, mit Hilfe des Elektronenmikroskops etwas über die Dynamik des biologischen Geschehens auszusagen, so z. B. die Mitteilungen von Ris, Nebel, Wohlfarth-Bottermann, Kuhnke, Rothsuh, Manni, Schneider, Mühlethaler u. a.

Wie es neuerdings üblich geworden ist, sind die Beiträge in verschiedenen Sprachen gehalten. Etwa 90 sind englisch, 50 deutsch und rund 20 französisch abgefaßt. Die Ausstattung des Bandes, Papier und Druck — bei so vielen Bildern ja besonders wichtig — ist über alles Lob erhaben. Der Preis allerdings dürfte bei uns noch in den dafür besonders empfindlichen anglo-amerikanischen Ländern besondere Begeisterung erwecken.

W. U r l (Wien).

Leduc, E., W. Byczkowska-Smyk et W. Bernhard: Essais de cytochimie ultrastructurale. Digestion par la pepsine et la trypsine. C. R. Acad. Sci. (Paris) 250, 4052—4054 (1960).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß biologische Feinstrukturen nach 15minütiger Fixation in 10%igem Formalin (pH 7,2) bei 30°C und Einbettung in ein wasserlösliches Einbettungsmittel (Stäubli, C. R. Acad. Sci. [Paris] 250, 1137 [1960]) noch im fertigen Dünnschnitt dem Angriff zweier verschiedener Proteinasen, nämlich Trypsin und Pepsin, zugänglich sind. Die Reaktion des analysierten Substrats (Leber- und Pankreaszellen) steht mit anderen Befunden über die Wirkung dieser Fermente in guter Übereinstimmung: 0,5%iges Pepsin in salzsaurer Lösung verdaut innerhalb von 5 bis 30 Min. die Substanz der Mitochondrien und der Zymogengranula, scheint also saure Eiweiße anzugreifen. 0,3%iges Trypsin bei pH 8 dagegen verdaut die elektronenmikroskopisch sichtbaren Strukturen des Ergastoplasmas und des Chromatins (bas. Eiweiße). Die fermentative Wirkung des Trypsins wird verzögert, wenn bei 20°C statt bei 30°C fixiert wird, nach Osmiumtetroxyd-Fixation kann ein enzymatischer Angriff überhaupt nicht mehr erfolgen. Die Wirkung der Enzyme auf den fertigen Dünnschnitt tritt innerhalb von 5 Minuten bis 48 Stunden ein: Die Schnelligkeit der Fermentreaktionen ist direkt von der Länge der Formalin-Fixierung abhängig.

Die Tatsache, daß die elektronenmikroskopisch sichtbaren Feinstrukturen der Zelle (die nach der hier angewandten Formalin-Fixierung prinzipiell gleich wie nach Osmiumfixierung ausfallen) noch enzymatisch andauar sind, ist eine weitere interessante Stütze für ihre Naturtreue. Die Möglichkeit, durch Behandlung von fertigen Dünnschnitten mit Proteinasen und anderen Fermenten eine cytochemische Identifizierung elektronenmikroskopisch sichtbarer Feinstrukturen durchzuführen, sollte in ihrer Bedeutung nicht unterschätzt werden, wengleich sie bis jetzt an das verwendete wasserlösliche Einbettungsmittel gebunden ist. Es eröffnen sich hier neue und weite Möglichkeiten einer elektronenmikroskopischen Cytochemie, die durchaus zu einer Verfeinerung der klassischen Histochemie führen können.

K. E. Wohlfarth-Bottermann (Bonn).

Lundegårdh, H.: Pflanzenphysiologie. Mit 283 Figuren, XV, 717 S. Jena: VEB Gustav Fischer-Verlag 1960. Geb. DM 48.70.

Das zur Besprechung vorliegende Buch ist die deutschsprachige Neubearbeitung eines 1950 in Schweden erschienenen Lehrbuches der gesamten Pflanzenphysiologie. Dieses war aus Vorlesungen entstanden, wurde aber schon in der ersten Auflage durch Verarbeitung der Erfahrungen eigener Forschertätigkeit sowie des einschlägigen internationalen Schrifttums zu einer umfassenden Darstellung der Pflanzenphysiologie.

In der nunmehr erschienenen deutschen Ausgabe des Werkes wurde die bis 1958 erschienene neuere Literatur einbezogen und auch verschiedene Umarbeitungen vorgenommen, so daß nunmehr wieder ein in einem Guß gestaltetes, modernes Lehrbuch der Pflanzenphysiologie vorliegt, das sich dem bisher als „Lundegårdh“ bekannten, in fünf deutschen Auflagen erschienenen Werk „Klima und Boden in ihrer Wirkung auf das Pflanzenleben“ an die Seite stellt.

In 11 Kapiteln werden die Zelle und das Protoplasma, die Entwicklung und Formbildung der Zelle, die anatomischen Grundlagen der physiologischen Prozesse, Photosynthese und Kohlehydratbildung, Atmung und Gärung, der Stickstoffstoffwechsel, Aufnahme und Transport der Mineralnährstoffe, die Beziehungen zwischen Nährstoffaufnahme und Wachstum, die Wasserbilanz, das Wachstum und die Bewegungen der Pflanze behandelt. Die Aufnahme einer kurzen Behandlung der Anatomie der Pflanze vom Blickpunkt ihrer Beziehungen zu den physiologischen Leistungen ent-

spricht einer auch in verschiedenen anderen modernen Lehrbüchern der allgemeinen Botanik zum Vorteil der Gesamtdarstellung bereits bewährten Gepflogenheit. Hinweise auf anatomisch-morphologische und ökologische Anpassungen beleben und ergänzen einzelne physiologische Kapitel.

Man wird vielleicht bemängeln dürfen, daß manche noch nicht vollkommen geklärte Fragen in etwas zu gesicherter Form dargestellt werden. Das Buch ist hinsichtlich Papier, Druck und Abbildungsmaterial gut ausgestattet.

R. Biebl (Wien).

Medizinische Grundlagenforschung. Unter Mitwirkung von K. Bucher, W. Doerr, F. Flügel, A. Grumbach, G. Hegemann, N. Henning, H. Holzer, A. Kornmüller, J. Kühnau, H. Schaefer, H. Schoen. Herausgegeben von K. Fr. Bauer. Band III. Mit 205 Abb., 47 Tab., 754 S. Stuttgart: Georg Thieme-Verlag. 1960. Ganzl. DM 178.—

Es liegt der 3. Band eines Werkes vor, dessen Inhalt durch den Titel nicht ohne weiteres gekennzeichnet ist. Dem Wesen nach kann es mit den Bandfolgen von „Ergebnissen...“ verglichen werden, nur daß hier nicht ein engumschriebenes Fach- oder Forschungsgebiet behandelt wird. Vielmehr betreffen die 15 Einzeldarstellungen des Bandes, die zum Großteil ohne sachliche Beziehungen aufeinanderfolgen, die heterogensten Probleme: von psychiatrischen über physikalische und biochemische bis zu solchen aus der Evolution. Es kann daher diesem Bericht nicht erlassen werden, die einzelnen Aufsätze anzuführen, wobei deren Inhalt natürlich auch nicht im entfernten ausreichend referiert werden kann.

Nach einem kurzen Vorwort des Herausgebers K. Fr. Bauer behandelt M. Gozzano (Rom) die Methodik der modernen psychiatrischen Forschung (biologische, physiologische, klinische, experimentelle Gesichtspunkte sind wie psychosomatische Wechselbeziehungen berücksichtigt). A. Asenjo (Santiago de Chile) klassifiziert die Gefäßmißbildungen und Gefäßtumoren des Gehirns nach eigenen anatomischen und röntgenographischen Untersuchungen (angeborene, erworbene Läsionen, Tumoren und gemischte Läsionen mit Untergruppierungen). Zwei Beiträge beschäftigen sich mit dem Tonus der Skelettmuskulatur und zwar Göpert (Freiburg) mit dem Problem an sich, v. Eiff (Bonn) mit den klinischen Aspekten des Problems. Ein umfangreicher Artikel behandelt erschöpfend und bis ins Physikalische gehend die „Grundlagen und Ergebnisse der In-Vivo-Messung radioaktiver Substanzen im menschlichen Organismus“. Anschließend widmen sich G. Barth und W. Frik (Erlangen) dem „Strahlenschutz in ärztlicher Sicht“, ausgehend von physikalischen über pathologische Betrachtungen bis zu Meßmethoden und zu den Schutzmaßnahmen in der Röntgentherapie und Röntgendiagnostik. Nur kurz wird der chemische Strahlenschutz und der Schutz bei Arbeiten mit aktiven Substanzen dargestellt.

Ein ganz anderes Gebiet, das Problem „Eiweißmolekül“ erörtern F. Turba (Würzburg) und W. Zillig (München). Ersterer bringt einige jener Kapitel aus der Biochemie der Proteine, in denen neuerdings wesentliche Fortschritte zu berichten sind; hier werden nicht nur die Strukturanalyse, sondern auch die Beziehungen zwischen Struktur und biologischer Funktion behandelt. Zillig beschäftigt sich mit der Biosynthese der Proteine in zwei Teilfragen: Wie liefert die Zelle die Energie für den Aufbau von Peptidketten und auf welche Weise bzw. in welchen Orten produziert die Zelle aus 20 freien Aminosäuren spezifische Eiweißindividuen mit definierter Funktion. Auch ein weiterer Beitrag fällt in das Gebiet der Eiweißkörper: „Der neueste Stand der Plasmaproteinforschung“ von E. Schultze und K. Heide, beide Behringwerke Marburg a. d. Lahn. — Es folgt eine Abhandlung über biochemische, physiologische und klinische Probleme des Fruktosestoffwechsels von F. Leuthardt (Zürich) und

K. Stuhlfauth (München), weiters über „Fat Metabolism and Atherosclerosis“ von L. W. Kinsell (Oakland) — „Saftstrom (Kapillaraustausch) bei höheren Wirbeltieren“ von W. Schroeder (Frankfurt), „Die biologische Bedeutung der Blutgerinnung beim Menschen“ von S. Witte und „Zur Frage des Mechanismus der Prothrombinaktivierung“ von H. Schröder (Würzburg) sind eine weitere Gruppe von Beiträgen. Den Abschluß bilden Darstellungen über „Struktur und Funktion der Synovialgewebe“ von D. V. Davies (London) und C. H. Barnett (London), schließlich ein Aufsatz aus ganz anderem Gebiet: „Unser heutiges Wissen von der Evolution“ von W. Zimmermann (Tübingen). — Nach dem Vorwort des Verfassers hat das Werk den Zweck, der klinischen Medizin Rüstzeug und Erkenntnisse naturwissenschaftlicher und theoretisch-medizinischer Forschungsgebiete zugänglich zu machen. Dieser Zweck erscheint erreicht. Die Artikel sind sehr sorgfältig abgefaßt, gehen zum Teil auch sehr ins Einzelne. Wertvoll sind die umfangreichen Literaturverzeichnisse am Schluß jeden Beitrages. Druck und Ausstattung sind ausgezeichnet.

A. Pischinger (Wien).

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

- Werth, W.: Vergleichende Untersuchungen über die relative Permeabilität des Protoplasmas für Alkohol und Wasser 27. 6. 1960
- Käppner, W.: Bewegungsphysiologische Untersuchungen an der Amöbe *Chaos chaos* L. (II. Die Wirkung von Salyrgan, Cystein und ATP) . . . 14. 7. 1960
- Schneider, L.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von Strahlen auf das Cytoplasma. (I. Die Frühwirkungen von Röntgenstrahlen auf das Cytoplasma von *Paramecium*) 20. 8. 1960
- Schneider, L.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von Strahlen auf das Cytoplasma. (II. Die Spätwirkung von Röntgenstrahlen auf das Cytoplasma von *Paramecium*) 20. 8. 1960
- Parker, J., and D. E. Philpott: An Electron Microscopic Study of Chloroplast Condition in Summer and Winter in *Pinus strobus* 28. 8. 1960
- Klima, J.: Elektronenmikroskopische Studien über die Feinstruktur der Trikladen (*Turbellaria*) 8. 9. 1960
- Miličić, D., und Z. Udjbinac: Virus-Eiweißspindeln der Kakteen in Lokalisationen von *Chenopodium* 15. 9. 1960
- Blochinger, A.: Die Wirkung cancerogener und östrogenen Stoffe auf Pflanzen 22. 9. 1960
- Falke, D., und J.-E. Richter: Phasenkontrastmikroskopische Befunde zur Bildung mehrkerniger Kulturzellen. 8. 10. 1960
- Kamiya, N.: Protoplasmaströmung 28. 10. 1960
- Wohlfarth-Bottermann, K. E.: Cytologische Studien VIII. Zum Mechanismus der Cytoplasmaströmung in dünnen Fäden 31. 10. 1960
- Campbell, A. D., W. D. Seward, Th. E. Gilmer, Jr. and E. G. Huf: Automatic Recording of Electric Potential and Ion Transport in Frog Skin 15. 12. 1960
- Jarosch, R., und O. Kiermayer: Spirochaeten im Rhizopodenplasma . . 24. 12. 1960
- Kinzel, H., und Erika Bolay: Über die diagnostische Bedeutung der Entmischungs- und Fällungsformen bei Vitalfärbung von Pflanzenzellen . . 16. 1. 1961
- Höfler, K.: Osmotisch bedingte polare Verlagerungen im Protoplasten von *Cladophora prolifera* 18. 2. 1961
- Diskus, A.: Über den Bau des Vakuolensystems einiger *Cladophora*-Arten 12. 3. 1961
- Thaler, Irmtraud: Eiweißkörper in *Neomonospora furcellata* 15. 3. 1961
- Wohlfarth-Bottermann, K. E.: Cytologische Studien IX. Die elektronenmikroskopische Feinstruktur des Grundcytoplasmas nach „wasserlöslicher Einbettung“ 16. 3. 1961
- Turian, G.: Cytoplasmic Differentiation and Dedifferentiation in the Fungus *Allomyces* 16. 3. 1961
- Jonek, J. J.: Über das Verhalten der Phosphatasen und Lipasen in den Nebennieren vom Kaninchen während der pharmakologischen Hypothermie 20. 3. 1961
- Stadelmann, E.: Zur Wirkung von α -Strahlen auf Plasma und Zellorganellen von *Allium-cepa*-Epidermen 21. 3. 1961

SPRINGER-VERLAG IN WIEN

Methoden zur Bestimmung pflanzlicher Wuchsstoffe

Von

Dr. phil. **Hans Linser**

Privatdozent an der Technischen Hochschule und an der Hochschule für Bodenkultur, Wien
Leiter des Biologischen Laboratoriums der „Österreichischen Stickstoffwerke Aktiengesellschaft“, Linz

und

Dr. phil. **Oswald Kiermayer**

Biologisches Laboratorium der „Österreichischen Stickstoffwerke Aktiengesellschaft“, Linz

Mit 98 Textabbildungen. VII, 181 Seiten. Gr.-8°. 1957

Ganzleinen S 198.—, DM 33.—, sfr. 33.80, \$ 7.85

.... In diesem Werk werden 63 verschiedene Testmethoden angegeben, von denen die wichtigsten besonders breit behandelt sind. Stets wird nach einer kritischen Wertung und einer physiologischen Charakteristik der einzelnen Verfahren gestrebt. Der nicht unmittelbar auf diesem Gebiet Tätige nimmt mit Respekt zur Kenntnis, wie viel Fleiß und Geduld hier auf methodischem Gebiet eingesetzt wurde. Hoffentlich wird die aufgewendete Mühe bald Früchte tragen, den großen Schritt von der empirischen zur kausalen Behandlung des Themas ermöglichen und zum Einblick in die biochemischen Zusammenhänge der Wuchsstoffwirkung führen. Man wird von dem Buch erwarten dürfen, daß es diesen weiteren Fortschritt wesentlich fördern wird."

Phyton

Archiv für die gesamte Virusforschung

Begründet von R. Doerr

Herausgegeben von S. Gard, Stockholm, C. Hallauer, Bern, K. F. Meyer, San Francisco

E. G. Nauck, Hamburg, A. B. Sabin, Cincinnati

Schriftleitung: C. Hallauer, Bern

Zuletzt erschien:

Band X, Heft 5 (Schlußheft): (Abgeschlossen im Dezember 1960.) Mit 57 Textabbildungen.
161 Seiten. 1961. S 246.—, DM 39.—, sfr. 41.90, \$ 9.75

Inhaltsverzeichnis: Lorenz, R. J., Über den Einfluß des Pipettierfehlers auf die Genauigkeit bei der Konzentrationsmessung von Viruslösungen. — Lorenz, R. J., Untersuchungen über die Dosis-Wirkungs-Beziehung und die Genauigkeit bei Virustitrierungen. — Klameth, O., Die Beeinflussung der Aktivitäten von Gewebsenzymen durch Virusinfektion. — Reczko, Eva, Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Virus der Stomatitis vesicularis. — Tongeren, H. A. E. van, and W. C. Timmers, Antibody Studies in Coots (*Fulica atra*) to Russian Spring-Summer Encephalitis (CEE) Virus in the Netherlands. The Behaviour of this Virus in experimentally inoculated Coots. — Schmidt, W. A. K., W. Höpken and R. Wohlrab, Untersuchungen zur Komplementbindungs-Reaktion der Poliomyelitis. — Lippelt, H., and E. Mannweiler, Das Verhalten von Influenzaviren in Gewebekulturen von Hühnerembryo-Nieren. I. — Mannweiler, E., Das Verhalten von Influenzaviren in Gewebekulturen von Hühnerembryo-Nieren. II. — Mannweiler, E., Das Verhalten von Influenzaviren in Gewebekulturen von Hühnerembryo-Nieren. III. — Beasley, Annie R., W. Lichter, and M. M. Sigel, Studies on Latent Infections of Tissue Cultures with Dengue Virus. — Yoshino, K., A. Kondo, N. Kuma, and H. Taniguchi, Infection of the One-Day Old Fertile Hen's Egg with Rabies Virus. VI. — Yoshino, K., M. Suzuki, and A. Kondo, Infection of the One-Day Old Fertile Hen's Egg with Rabies Virus. VII.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

